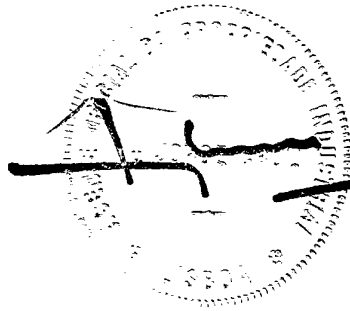


91.543

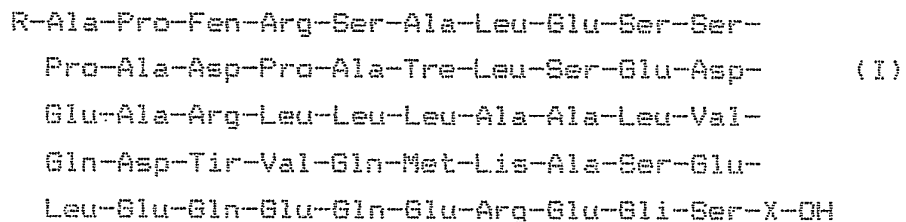


CIBA-GEIGY AG
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTÍDOS FLANQUEADORES"
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

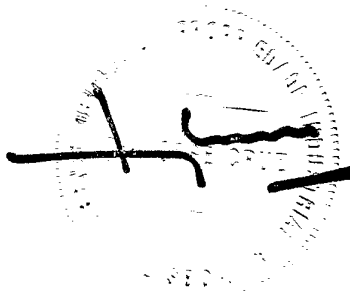
O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de peptídeos de fórmula I



em que R representa hidrogénio ou acetilo e X a sequência de aminoácidos de fórmula -Ser-Leu-Asp-Ser-Pro-Arg-Ser- (Ia) ou de fórmula -Arg-Ile-Ile-Ala-Gln (Ib), e dos sais dos referidos compostos.

Estes compostos são utilizados no tratamento de doenças que envolvem degeneração dos ossos.

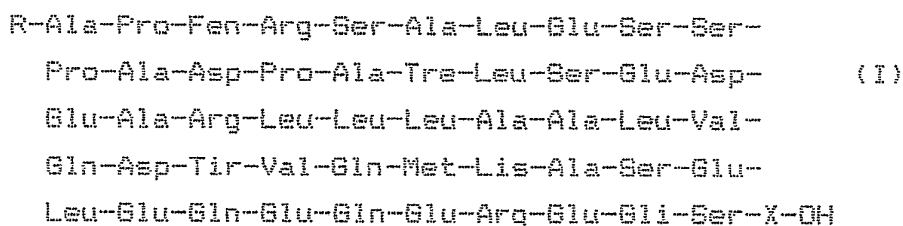
O processo para a sua preparação consiste, por exemplo, em se formar, uma ligação amida presente num composto com a



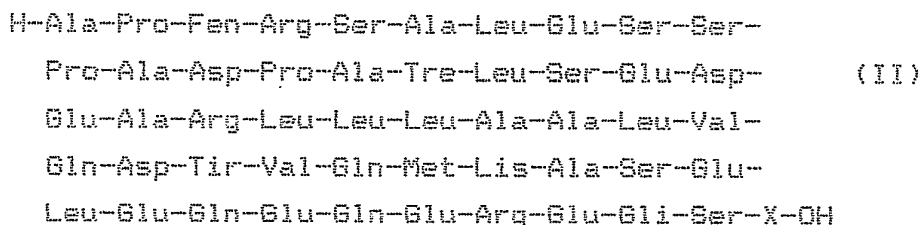
sequência de amino ácidos de fórmula I, por reacção de um fragmento desse composto, que apresenta um grupo carboxi livre reactivo, ou um seu derivado de ácido carboxílico reactivo, com o fragmento complementar do referido composto, que apresenta um grupo amino livre, ou com um seu derivado reactivo, em que os grupos funcionais livres nos referidos fragmentos, com a excepção dos dois grupos que participam na reacção, estão, se necessário, numa forma protegida, e por se remover os grupos protegidos que possam estar presentes.

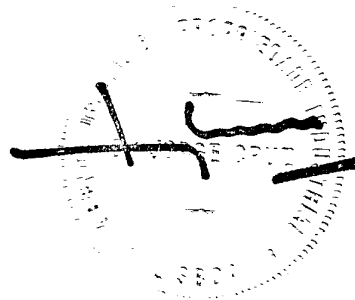
O invento diz respeito a novos péptidos, em particular a péptidos flanqueadores da procalcitonina humana N-terminal, aos seus sais, a determinadas sequências de DNA e a microrganismos contendo essas sequências de DNA que se encontram aptos para a produção dos péptidos de acordo com o invento, como produtos intermediários para a preparação dos referidos péptidos, a um processo para a preparação dos péptidos ou das sequências de DNA, a preparações farmacêuticas contendo os referidos péptidos ou sais dos mesmos, bem como à utilização desses péptidos ou dos seus sais como produtos farmacêuticos.

O invento diz respeito em particular a péptidos de fórmula I



em que R representa hidrogénio ou acetilo e X a sequência de amino ácidos de fórmula -Ser-Leu-Asp-Ser-Pro-Arg-Ser- (Ia) ou de fórmula -Arg-Ile-Ile-Ala-Gln (Ib), em particular péptidos de fórmula

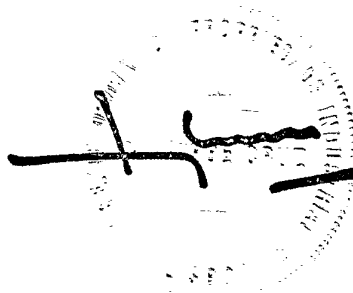




em que X representa, de preferência, a sequência de amino ácidos de fórmula (Ia) (PCATFP: péptidos flanqueadores de procalcitonina humana amino terminal), que também é designada por PAB-57 (Péptido Alanina Serina-57), e ainda os de fórmula (Ib) (PCGRPATFP: péptidos flanqueadores amino-terminal do péptido relacionado com o gene da procalcitonina humana, bem como os sais dos referidos péptidos.

Em conformidade com as regras de nomenclatura reconhecidas internacionalmente, as abreviaturas representam neste pedido de patente os amino ácidos, por exemplo, os que atrás foram referidos, os ácidos livres e, quando nada for indicado em contrário, a sua configuração L. O grupo α -amino encontra-se respectivamente no lado esquerdo da abreviatura e o grupo carboxilo do lado direito. A ausência de um átomo de H no grupo α -amino é caracterizada por um traço de união presente à esquerda da abreviatura do amino ácido, a ausência de um grupo HO no grupo carboxi é expressa através de um traço de união presente à direita. Os substituintes na cadeia lateral dos amino ácidos livres ou dos seus radicais são colocados entre parêntesis imediatamente atrás do símbolo do amino ácido.

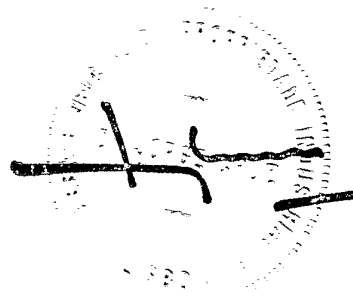
Depois da data de prioridade do presente pedido de patente descobriu-se que os péptidos de acordo com o invento se encontram como tais no organismo humano. Por esse motivo, o invento diz respeito, em primeiro lugar, aos péptidos atrás referidos e aos seus sais numa concentração mais elevada do que aquela que existe na natureza ou em extractos eventualmente conhecidos. O invento diz respeito, em particular, aos péptidos atrás referidos sob uma forma isolada ou enriquecida, sob uma forma simples ou essencialmente simples, num ambiente essencialmente diferente em relação àqueles que surjem na natureza, isto é, com outras misturas, por exemplo, misturados com veículos



farmacêuticos, numa forma de utilização farmacêutica adequada, numa forma característica e/ou numa forma que não a de um organismo vivo ou morto, de um órgão, de uma célula, de um tecido ou de um líquido corporal. O invento refere-se, particularmente, a péptidos de fórmula (I) e aos seus sais produzidos sinteticamente ou obtidos por engenharia genética.

No contexto atrás referida o termo "isolado" significa separado de outras substâncias, em particular de outros compostos químicos com os quais os compostos de acordo com o invento podem eventualmente aparecer na natureza. O termo "puro" significa submetido a métodos químicos e/ou físicos de purificação. O termo "essencialmente puro" significa um grau de pureza superior a 50%.

O invento também diz respeito aos sais, em particular aos sais não tóxicos, farmacêuticamente aceitáveis dos péptidos de acordo com o invento. Os péptidos atrás referidos podem formar sais de adição de ácidos, por exemplo, com ácidos inorgânicos, em particular ácidos minerais, por exemplo, ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, ou sais com ácidos carboxílicos, sulfénicos ou sulfo, por exemplo, ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido cinâmico, ácido salicílico, ácido 4-amino-salicílico, ácido 2-fenoxibenzóico, ácido 2-acetoxibenzóico, ácido embónico, ácido nicotínico ou ácido isonicotínico, e ainda amino ácidos, tais como ácido metanossulfónico, ácido etanossulfónico, ácido 2-hidroxietanossulfónico, ácido etan-1,2-dissulfónico, ácido bezenossulfónico, ácido 4-metil-benzenossulfónico ou ácido naftalín-2-sulfónico, ou com outras composições orgânicas ácidas, tais como ácido ascórbico.



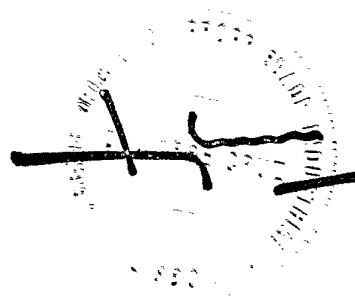
Os péptidos atrás referidos podem formar também sais metálicos ou de amónio, tais como ácidos de metais alcalinos e metais alcalino terrosos, por exemplo, sais de sódio, potássio, magnésio ou cálcio, bem como sais de amónio com amoníaco ou aminas orgânicas adequadas, situando-se na primeira linha, para a formação de sais, mono-, di- ou poli-aminas primárias, secundárias ou terciárias alifáticas, cicloalifáticas, cicloalifáticas-alifáticas ou aralifáticas, bem como bases heterocíclicas, tais como alquil inferior amina, por exemplo, trietilamina, hidroxi alquil inferior amina, por exemplo, 2-hidroxi-etilamina, bis-(2-hidroxi-etil)-amina, 2-hidro-etil-di-etil-amina ou tri-(2-hidroxi-etil)-amina, ésteres básicos alifáticos de ácidos carboxílicos, por exemplo, éster 2-dietilamino-etílico de ácido 4-aminobenzóico, alquilenos inferior amina, por exemplo, 1-etilpiperidina, cicloalquilamina, por exemplo, diciclohexilamina, ou benzilamina, por exemplo, N,N'-ddibenziletilenodiamina, e além disso bases do tipo piridina, por exemplo, piridina, colidina ou quinolina.

Os péptidos acima referidos podem além disso formar sais internos.

Para isolamento ou purificação também podem ser de utilidade sais farmacêuticamente não adequados. Para aplicação farmacêutica apenas servem, no entanto, os sais não tóxicos farmacêuticamente adequados, que são por isso os preferidos.

Os compostos de acordo com o invento podem ser preparados de maneira conhecida per se, por exemplo

- a) formando uma ligação amida presente num composto com a sequência de amino ácidos de fórmula I, por reacção de um fragmento desse composto, que apresenta um grupo carboxi livre reactivo, ou um seu derivado de ácido carboxílico



reactivo, com o fragmento complementar do referido composto, que apresenta um grupo amino livre, ou com um seu derivado reactivo, em que os grupos funcionais livres nos referidos fragmentos, com a excepção dos dois grupos que participam na reacção, estão, se necessário, numa forma protegida, e removendo os grupos protegidos que possam estar presentes, ou

b) propagando células hospedeiras, transformadas com um vector de expressão, que contém uma sequência de DNA que codifica a sequência de amino ácidos de fórmula I e que é regulada por uma sequência de controlo de expressão, e, caso seja necessário, libertando das células hospedeiras um composto com a sequência de amino ácidos de fórmula I, e isolando,

e, quando for necessário, num composto obtido de acordo com o invento, que contém um agrupamento sulfóxido, convertendo este agrupamento num grupo tio, e sempre que se deseje, convertendo o sal obtido de acordo com o processo no composto livre e/ou convertendo o composto livre obtido de acordo com o processo num sal.

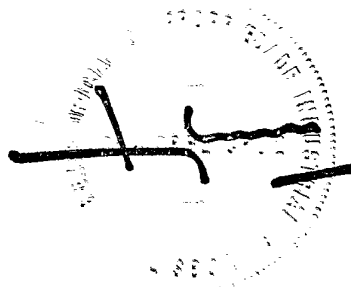
Processo a: De acordo com este processo é ligada, como última fase da reacção, na síntese do produto final, uma combinação amida num lugar qualquer da sequência de amino ácidos de fórmula I. No que respeita ao fragmento referido, pode tratar-se tanto de um único amino ácido, como de um di-, oligo- ou poli-péptido. Esse fragmento, que apresenta um grupo amino livre, representa igualmente um único amino ácido, um di-, oligo- ou poli-péptido.



A reacção efectua-se, de preferência, de modo a fazer reagir um derivado de ácido reactivo do fragmento com o fragmento complementar que apresenta um grupo amino livre, podendo assim a derivatização do grupo carboxi do fragmento de ácido carboxílico efectuar-se também in situ.

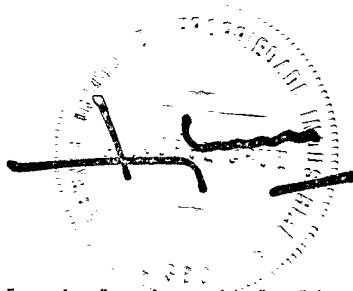
Os derivados de ácido carboxílico reactivos são em primeiro lugar ésteres activados reactivos ou anidridos reactivos e ainda amidas cíclicas reactivas; neste caso podem, tal como se referiu, formar-se derivados de ácido carboxílico reactivo também in situ.

Os ésteres activados são, em particular, ésteres insaturados no átomo de carbono de ligação ao radical que se pretende esterificar, por exemplo, do tipo ésteres vinílicos, tal como os ésteres vinílicos propriamente ditos (que se podem obter, por exemplo, por esterificação de um éster correspondente, com acetato de vinilo; Método do éster vinílico activado), ésteres carbamoilvinílicos (que se podem obter, por exemplo, através do tratamento do ácido correspondente com um reagente de isoxazólio; Método do 1,2-oxazólio ou Método Woodward), ou ésteres 1-alcoxi inferior vinílicos (que se podem obter através do tratamento do ácido correspondente com um alcoxi inferior acetileno; Método do etoxi-acetileno), ou do tipo amidino, tal como ésteres N,N'-amidino di-substituídos (que se podem obter por tratamento do ácido correspondente com uma carbodiimida N,N'-di-substituída adequada, por exemplo, N,N'-diisopropil- ou N,N'-díciclohexilcarbodiimida; Método da carbodiimida), ou ésteres amidino di-substituídos (que se podem obter por tratamento do ácido correspondente com uma cianamida N,N'-di-substituída; Método da cianamida). Os ésteres activados são, além disso, por exemplo, ésteres arílicos adequados, em particular, ésteres fenólicos adequados substituídos através de substituintes que atraem os electrões (que se podem



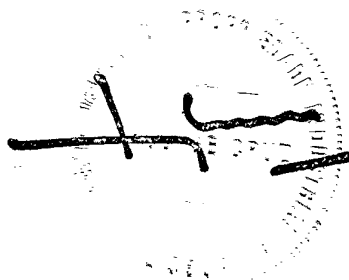
obter, por exemplo, por tratamento do ácido correspondente com um fenol substituído adequado, por exemplo, 4-nitrofenol, 4-metil-sulfonil-fenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,3,4,5,6-pentaclorofenol ou 4-fenildiazofenol, na presença de um agente de condensação, tal como a N,N'-diciclohexil-carbodiimida; Método dos ésteres arílicos activados), ésteres cianometílicos (que se podem obter por tratamento do ácido correspondente com cloroacetoneitrilo na presença de uma base; Método do éster cianometílico), tio-ésteres adequados, em particular tio-ésteres fenílicos eventualmente substituídos, por exemplo, com nitro (que se podem obter, por exemplo, por tratamento do ácido correspondente com tiofenóis eventualmente substituídos, por exemplo, com nitro e também com o auxílio do Método dos anidridos ou das carbodiimidas; Método dos ésteres tiol activados), ou amino- ou amido-ésteres (que se podem obter por tratamento do ácido correspondente com um composto N-hidroxi-amino ou hidroxi-amido, por exemplo, N-hidroxi-succinimida, N-hidroxi-piperidina, N-hidroxi-ftalimida ou 1-hidroxi-1H-benzotriazol, por exemplo, de acordo com o Método dos anidridos ou da carbodiimida; Método dos ésteres N-hidroxi activados).

Os anidridos ácidos reactivos podem ser simétricos ou, de preferência, anidridos mistos desses ácidos, ou seja, por exemplo, anidridos com ácidos inorgânicos, tais como haletos de ácidos, em particular cloretos de ácidos (que se podem obter, por exemplo, por tratamento do ácido correspondente com um agente de halogenação adequado, tal como cloreto de tionilo, pentacloreto de fósforo ou cloreto de oxalilo; Método do cloreto de ácido), azidas (que se podem obter, por exemplo, a partir de um éster de ácido através da hidrazida correspondente e por tratamento da mesma com ácido nítrico; Método da azida), anidridos com hemi-derivados de ácido carbónico, tal como os ésteres correspondentes, por exemplo, hemi-ésteres de alquilo inferior de ácido carbónico (que se podem obter por tratamento do ácido



correspondente com ésteres de alquilo inferior halofórmicos, por exemplo, clorofórmicos ou com 1-alcoxi inferior carbonil-2-alcoxi inferior-1,2-di-hidroquinolina, por exemplo, 1-alcoxi inferior-carbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina; Método dos anidridos mistos de ácido O-alquilcarbónico), ou anidridos com ácido fosfórico di-halogenado, em especial, di-clorado (que pode ser obtido, por exemplo, tratando o ácido correspondente com oxicloreto de fósforo; Método do oxicloreto de fósforo), ou anidridos com ácidos orgânicos, tais como anidridos mistos com ácidos carboxílicos orgânicos (que podem ser obtidos, por exemplo, tratando o ácido correspondente com um haleto de ácido alcanocarboxílico inferior ou fenil-alcano-carboxílico inferior substituído ou insubstituído, por exemplo, cloreto de ácido fenilacético, ácido pivalico ou ácido trifluoroacético; métodos dos anidridos mistos de ácido carboxílico) ou com ácidos sulfônicos orgânicos (que podem ser obtidos, por exemplo, tratando um sal, tal como um sal de metal alcalino, do ácido correspondente, com um haleto de ácido sulfônico orgânico adequado, tal como cloreto de ácido alcanossulfônico ou arilssulfônico inferior, por exemplo, cloreto de ácido metano- ou p-toluenossulfônico; Método dos anidridos de ácido sulfônico), bem como anidridos simétricos (que podem ser obtidos por condensação do ácido correspondente na presença de uma carbodiimida ou de 1-dietilaminopropina; Métodos dos anidridos simétricos).

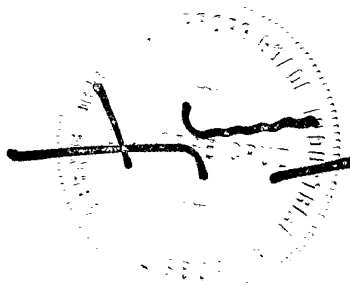
As amidas cíclicas adequadas são, em particular, amidas com ciclos diaza de cinco membros de carácter aromático, tais como amidas com imidazóis, por exemplo imidazole (que pode ser obtido, por exemplo, tratando o ácido correspondente com N,N'-carbonildiimidazole; Método da imidazolida) ou pirazóis, por exemplo, 3,5-dimetilpirazóis (que podem ser obtidos, por exemplo, por meio da hidrazida do ácido por tratamento com acetilacetona; Método da pirazolida).



Tal como foi mencionado, os derivados de ácido carboxílico podem também formar-se in situ. Por exemplo, os ésteres de amidino N,N'-di-substituído podem formar-se in situ fazendo reagir a mistura do fragmento complementar contendo o grupo amino livre e o fragmento do péptido contendo o grupo carboxi livre na presença de uma carbodiimida N,N'-di-substituída adequada, por exemplo, N,N'-diisopropil- ou N,N'-díciclohexil-carbodiimida. Além disso, os ésteres amino ou amido dos ácidos podem formar-se na presença da amina que se pretende acilar fazendo reagir a mistura do ácido correspondente e os materiais de partida amino na presença de uma carbodiimida N,N'-di-substituída, por exemplo, N,N'-díciclohexil- ou N,N'-diisopropilcarbodiimida e na presença de uma N-hidroxiamina ou N-hidroxiamida, por exemplo, N-hidroxisuccinimida, facultativamente na presença de uma base adequada, por exemplo, 4-dimetilaminopiridina.

Alternativamente, o processo da variante a) também pode efectuar-se fazendo reagir um fragmento contendo um grupo carboxi livre com um fragmento complementar em que o grupo amino se encontra presente na forma reactiva; o grupo amino pode ser activado, por exemplo, por reacção com um fosfito, por exemplo, clorofosfito dietílico, clorofosfito 1,1-fenileno, diclorofosfito etílico, clorofosfito de etileno ou pirofosfito tetraetílico, ou com um agente de sililação adequado, tal como um halossilano orgânico, por exemplo, trimetilclorossilano. O grupo amino pode também ser activado ligando-o a um halocarbonilo, por exemplo, clorocarbonilo, ou pode ser activado sob a forma de um grupo isocianato.

Os grupos funcionais nos fragmentos mencionados que, se não se pretender que participem na reacção, se apresentam vantajosamente na forma protegida, são especialmente grupos carboxi, amino e hidroxí, e também grupos carbamilo e guanidino.



Os grupos protectores e a maneira como são introduzidos e removidos são descritos, por exemplo, em "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres, Nova Iorque 1973 e em "Methoden der Organischen Chemie" (Métodos da Química Orgânica), Houben-Weyl, 4ª edição, Vol. 15/1, Georg Thieme Verlag, Estugarda 1974 e em Theodora W. Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Nova Iorque 1981. é característico dos grupos protectores o facto de poderem ser facilmente removidos, isto é, sem se verificarem reacções secundárias, por exemplo, por solvólise, redução ou fotólise.

Os grupos protectores de hidroxil são, por exemplo, radicais acilo, tais como alcanóilo inferior substituído ou insubstituído, por exemplo, halo-substituído, tal como, 2,2,-dicloroacetilo, ou radicais acilo de hemi-ésteres de ácido carbónico, especialmente t-butoxicarbonilo, benziloxicarbonilo substituído ou insubstituído, por exemplo, 4-nitrobenziloxicarbonilo, ou difenilmetoxicarbonilo, ou 2-halo-alcoxi inferior carbonilo, tal como 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, ou formilo. Outros grupos protectores de hidroxil são, por exemplo, grupos eterificadores adequados, tais como tritilo, t-alquilo inferior, por exemplo, t-butilo, radicais hidrocarboneto 2-oxa- ou 2-tia-alifáticos ou -cicloalifáticos, em particular, 1-alcoxi inferior-alquilo inferior ou 1-alquil inferior tio-alquilo inferior, por exemplo, metoximetilo, 1-metoximetilo, 1-etoxietilo, metiltiométilo, 1-metiltioetilo ou 1-etiltioetilo ou 2-oxa- ou 2-tia-cicloalquilo com 5 a 6 átomos de carbono, por exemplo, 2-tetrahidrofurilo ou 2-tetrahidropiraniolo ou os análogos tia correspondentes e também 1-fenil-alquilo inferior substituído ou insubstituído, tal como benzilo ou difenilmetilo substituído ou insubstituído, sendo adequados como substituintes dos radicais fenilo, por exemplo, halogénio, tal como cloro, alcoxi inferior, tal como metoxi e/ou nitro. Outros grupos protectores de hidroxil são também radicais

sililo ou estanilo orgânicos que contêm, de preferência, alquilo inferior, em especial metilo e/ou arilo, por exemplo, fenilo como substituintes, especialmente tri-alquil inferior sililo, mais particularmente, trimetilsililo e também dimetil-t-butil-sililo ou estanilo correspondentemente substituído, por exemplo, tri-n-butilestanilo.

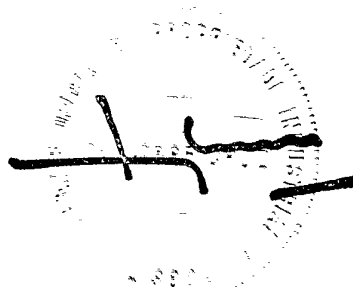
Os grupos carboxi são protegidos, de preferência, na forma esterificada, tal como agrupamentos éster facilmente cliváveis em condições suaves. Os grupos carboxi protegidos desta maneira contêm como grupos esterificadores especialmente grupos alquilo inferior que estão ramificados na posição-1 ou adequadamente substituídos na posição 1 ou 2. Os grupos carboxi preferidos na forma esterificada são, entre outros, t-alcoxi inferior carbonilo, por exemplo, t-butoxicarbonilo, α -aril-alcoxi inferior carbonilo contendo um ou dois radicais arilo, sendo estes radicais fenilo substituídos ou insubstituídos, por exemplo, com alquilo inferior, tal como t-alquilo inferior, por exemplo, t-butilo, alcoxi inferior, tal como metoxi, hidroxí, halogêneo, por exemplo cloro, nitro e/ou com fenilo, tal como benziloxicarbonilo que é substituído ou insubstituído, por exemplo, tal como atrás foi mencionado, por exemplo, 4-metoxiben-ziloxicarbonilo ou 4-nitrobenziloxicarbonilo, bifenililo-alcoxi inferior carbonilo em que o bifenililo substitui a posição α , por exemplo, 2-(p-bifenililo)-2-propoxicarbonilo, ou difenilmetoxicar-bonilo que é substituído ou insubstituído, por exemplo, tal como atrás foi mencionado, por exemplo, difenilmetoxicarbonilo ou di-(4-metoxifenil)-metoxicarbonilo, 1-alcoxi inferior-alcoxi inferior carbonilo, tal como metoximetoxicarbonilo, 1-metoxieto-xicarbonilo ou 1-etoximetoxicarbonilo, 2,2-diaril-etoxicarbonilo em que arilo é fenilo que é substituído ou insubstituído, por exemplo, com nitro, tal como 4-nitrofenilo, tal como 2,2-di-(4-nitrofenilo)-etoxicarbonilo, em que os dois radicais arilo, por



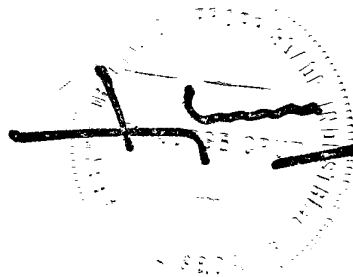
exemplo fenilo também podem estar ligados um ao outro, por exemplo 2-(9-fluorofenil)-etoxicarbonilo, 1-alquil inferior-tio-alcoxi inferior carbonilo, tal como 1-metiltiometoxicarbonilo ou 1-etiltiometoxicarbonilo, arilmetoxicarbonilo em que o grupo arilo é benzoilo que é substituído ou insubstituído, por exemplo, com halogénio, tal como, por exemplo, bromo, por exemplo, fenaciloxicarbonilo, 2-halo-alcoxi inferior carbonilo, 2-halo alcoxi inferior carbonilo, por exemplo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-bromoetoxicarbonilo ou 2-iodoetoxicarbonilo, ou 2-(sililo tri-substituído)-etoxicarbonilo em que cada um dos substituintes, independentemente uns dos outros, representam um radical hidrocarboneto alifático, cicloalifático ou aromático que é substituído ou insubstituído, por exemplo, com alquilo inferior, alcoxi inferior, arilo, halogénio e/ou com nitro tal como alquilo inferior insubstituído ou correspondentemente substituído, fenilo alquilo inferior, cicloalquilo ou fenilo, por exemplo, 2-tri-alquil inferior sililetoxicarbonilo, tal como 2-trimetilsililetoxicarbonilo ou 2-(metil-di-(n-butyl)-silil) -etoxicarbonilo, ou 2-triarilsililetoxicarbonilo, tal como 2-trifenilsililetoxicarbonilo.

Os grupos carboxi protegidos preferidos são, por exemplo, t-alcoxi inferior carbonilo, tal como t-butoxicarbonilo e benziloxicarbonilo que é insubstituído ou substituído, por exemplo, tal como atrás foi mencionado, 4-metoxi- ou 4-nitrobenziloxicarbonilo, ou difenilmetoxicarbonilo e também 2-(trimetilsilil)-etoxicarbonilo.

Um grupo amino protegido pode apresentar-se, por exemplo, sob a forma de um grupo acilamino, arilmetilamino, mercaptoamino eterificado, 2-acil inferior alqui-1-enilamino, sililamino ou estanilamino ou sob a forma de um grupo azido.

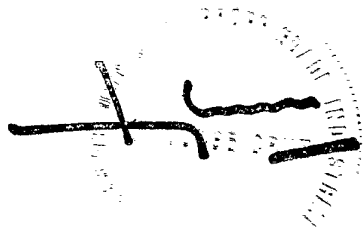


Num grupo acilamino correspondente, acilo é, por exemplo, o radical correspondente de um ácido carboxílico orgânico contendo, por exemplo, o máximo de 18 átomos de carbono, especialmente um ácido alcanocarboxílico insubstituído ou substituído, por exemplo, com halogéneo ou arilo, ou de um ácido benzóico insubstituído ou substituído, por exemplo, com halogéneo, por exemplo, cloro, alcoxi inferior, por exemplo, metoxi, nitro e/ou com fenilo, ou de um hemi-éster de ácido carbónico. Estes grupos acilo são, por exemplo, alcanoilo inferior, tal como formilo, acetilo ou propionilo, halo-alcanoilo inferior, tal como 2-haloacetilo, especialmente 2-cloro-, 2-bromo-, 2-iodo-, 2,2,2-trifluoro- ou 2,2,2-tricloroacetilo, benzoilo insubstituído ou substituído, por exemplo, com halogéneo, alcoxi inferior, nitro e/ou com fenilo, por exemplo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-metoxibenzoilo ou 4-nitrobenzoilo, ou alcoxi inferior carbonilo que é ramificado na posição 1 do radical alquilo inferior ou substituído adequadamente na posição 1 ou 2, em especial t-alcoxi inferior carbonilo, por exemplo t-butoxicarbonilo, α -alcoxi inferior carbonilo com um ou dois radicais arilo que são de preferência fenilo insubstituído ou substituído, por exemplo, com alquilo inferior, especialmente t-alquilo inferior, tal como t-butilo, alcoxi inferior, tal como metoxi, hidroxí, halogéneo, por exemplo, cloro, nitro e/ou com fenilo, tal como benziloxicarbonilo insubstituído ou substituído, por exemplo, 4-nitrobenziloxicarbonilo, bifenilil-alcoxi inferior carbonilo em que o bifenililo substitui a posição α , por exemplo, 2-(β -bifenilil)-2-propoxicarbonilo), ou difenilmetoxicarbonilo substituído, por exemplo, benzidriloxicarbonilo ou di-(4-metoxifenil)-metoxicarbonilo, 2,2-diariletoxicarbonilo em que arilo significa fenilo que é insubstituído ou substituído, por exemplo, com nitro, tal como 4-nitrofenilo, tal como, 2,2-di-(4-nitrofenil)-etoxicarbonilo, em que os dois radicais arilo, por exemplo, fenilo, podem também estar ligados um ao outro, por exemplo,



2-(9-fluorenil)-etoxicarbonilo, aroilmetoxicarbonilo, em que o grupo aroilo é de preferência benzoilo que é insubstituído ou substituído, por exemplo, com halogéneo, tal como bromo, por exemplo, fenaciloxicarbonilo, 2-halo-alcóxi inferior carbonilo, por exemplo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-bromoetoxicarbonilo ou 2-iodoetoxicarbonilo, ou 2-(silil tri-substituído)-etoxicarbonilo em que cada um dos substituintes, independentemente uns dos outros, é um radical hidrocarboneto alifático, cicloalifático ou aromático com o máximo de 15 átomos de carbono e é insubstituído ou substituído, por exemplo, com alquilo inferior, alcóxi inferior, arilo, halogéneo ou com nitro, tal como alquilo inferior, fenil-alquilo inferior, cicloalquilo ou fenilo insubstituídos ou substituídos correspondentes, por exemplo, 2-tri-alquil inferior sililetoxicarbonilo, tal como, 2-trimetilsililetoxicarbonilo ou 2-(di-n-butil-metil-silil) -etoxicarbonilo, ou 2-triarilsililetoxicarbonilo, tal como 2-trifenilsililetoxicarbonilo.

Outros radicais acilo adequados como grupos protectores de amino são também os radicais correspondentes de ácidos fosfóricos, fosfénicos ou fosfínicos orgânicos, tal como di-alquil inferior fosforilo, por exemplo, di-metilfosforilo, dietilfosforilo, di-n-propilfosforilo ou diisopropilfosforilo, dicicloalquilfosforilo, por exemplo diciclohexilfosforilo, difenilfosforilo insubstituído ou substituído, por exemplo, difenil fosforilo, di-(fenil-alquil inferior)-fosforilo que é insubstituído ou substituído, por exemplo, com nitro, por exemplo, di-benzilfosforilo ou di-(4-nitrobenzil)-fosforilo, fenoxifenilfosfonilo insubstituído ou substituído, por exemplo fenoxifenilfosfonilo, di-alquil inferior fosfinilo, por exemplo, di-etilfosfinilo, ou difenilfosfinilo insubstituído ou substituído, por exemplo, difenilfosfinilo.

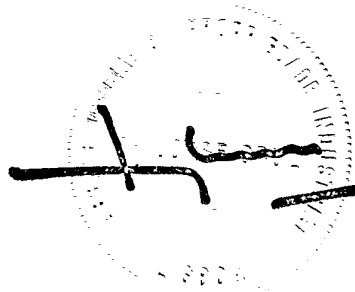


Num grupo arilmetilamino, que pode ser um grupo mono-, di- ou especialmente tri-arilmetilamino, os radicais arilo são em especial radicais fenilo insubstituídos ou substituídos. Esses grupos são, por exemplo, benzilamino, difenilmetilamino e especialmente tritilamino.

Um grupo mercapto eterificado num grupo amino protegido com um radical desse tipo é, em especial, ariltio ou aril-alquil inferior-tio, em que arilo significa particularmente fenilo que é insubstituído ou substituído, por exemplo, com alquilo inferior, tal como metilo ou t-butilo, alcoxi inferior, tal como metoxi, halogéneo, tal como cloro e/ou nitro. Um grupo protector de amino correspondente é, por exemplo, 4-nitrofeniltio.

Num radical 2-acil-alqu-1-en-1-ilo inferior que pode ser usado como grupo protector de amino, acilo significa, por exemplo, o radical correspondente de um ácido alcano inferior carboxílico, de um ácido benzóico que é insubstituído ou substituído, por exemplo, com alquilo inferior, tal como metilo ou t-butilo, alcoxi inferior, tal como metoxi, halogéneo, tal como cloro e/ou com nitro, ou especialmente de um hemi-éster de ácido carbónico, tal como um hemi-éster de alquilo inferior de ácido carbónico. Os grupos protectores correspondentes são, em particular, 1-alcancilo inferior prop-1-en-2-ilo, por exemplo, 1-acetilprop-1-en-2-ilo, ou 1-alcoxi inferior carbonilprop-1-en-2-ilo, por exemplo, 1-etoxicarbonil-prop-1-en-2-ilo.

Um grupo amino pode também ser protegido na forma protonada; como aniões correspondentes consideram-se especialmente os dos ácidos inorgânicos fortes, tais como os ácidos hidr-hálicos, por exemplo o anião do cloreto ou do brometo, ou ácidos sulfónicos orgânicos, tal como o ácido p-toluenossulfónico.



Os grupos protectores de amino preferidos são os radicais acilo dos hemi-ésteres do ácido carbónico, em especial, t-butoxicarbonilo, ou benziloxicarbonilo que é insubstituído ou substituído, por exemplo tal como indicado, por exemplo, 4-nitro-benziloxicarbonilo, ou difenilmetoxicarbonilo, 2-(9-fluorenil)-etoxicarbonilo, ou 2-halo-alcoxi inferior carbonilo, tal como 2,2,-tricloroetoxicarbonilo e também tritilo ou formilo.

Os grupos carbamilo insubstituídos são protegidos, por exemplo, sob a forma de derivados N-(9-xantenilo) ou sob a forma de derivados N-(mono-, di-, ou tri-arilmetilo), em que arilo é especialmente metilo que é insubstituído ou contém o máximo de 5 substituintes iguais ou diferentes, de preferência alquilo inferior, tal como metilo, alcoxi inferior, tal como metoxi. Podem mencionar-se como exemplos destes grupos protectores de arilmetilo os seguintes: 4-metoxibenzilo, 2,4,6-trimetoxibenzilo, difenilmetilo, di-(4-metoxifenil)-metilo, di-(4-metilfenil)-metilo e (4-metilfenil)-[veículo polimérico]-fenil)-metilo. Tritilo é um grupo protector de carbamilo preferido.

Os grupos guanidino podem ser protegidos, por exemplo, por meio de grupos sulfonilo substituídos adequados, tais como arilsulfonilo em que arilo é fenilo que é insubstituído ou contém, por exemplo, alquilo inferior, tal como metilo, ou benzo-heterociclilo, tal como cromanilo, que insubstituído ou substituído, por exemplo, com alquilo inferior, tal como metilo, e ligado por meio de um átomo aromático de carbono, tal como metoxifenilsulfonilo ou 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanilsulfonilo.

Neste pedido de patente deve entender-se por grupo protector, em particular um grupo protector de carboxi e também um veículo polimérico que está ligado ao grupo funcional a ser

protegido, especialmente a um grupo carboxi, por meio de um veiculo que é especialmente adequado para a chamada síntese de péptidos de Merrifield e que pode ser facilmente removido. Um tal veiculo polimérico pode ser, por exemplo, de preferência, uma resina de poliestireno de fraca ligação cruzada por copolimerização com divinilbenzeno, resina essa que contém membros em ponte adequados à ligação reversível dos resíduos de amino ácidos e de péptidos. Em relação especialmente às resinas de poliestireno de fraca ligação cruzada estes membros em ponte são, em particular, grupos metileno que são insubstituídos ou substituídos e que são ligados directamente a radicais aromáticos da resina de poliestireno. Os substituintes dos grupos metileno estão ligados aos grupos metileno de preferência por agrupamentos éter ou éster e contendo agrupamentos funcionais adequados que, juntamente com os grupos funcionais, especialmente os grupos carboxi, do fragmento de amino ácido ou péptido, podem formar grupos protegidos, em especial grupos carboxi correspondentes, tais grupos carboxi esterificados. Estes membros em ponte são, por exemplo, os radicais divalentes de alcoóis 4-metoxibenzílicos contendo facultativamente fenilo na posição α que é insubstituído ou substituído, por exemplo, na posição q - ou p , por exemplo, com alcoxi inferior, tal como metoxi, alcoóis 4-metoxibenzílicos esses em que o átomo de carbono do grupo 4-metoxi está ligado directamente a um radical fenilo da resina de poliestireno, e o grupo hidroxi benzílico esterifica a função carboxi do amino ácido ou do fragmento de péptido.

A reacção para formar a ligação amida pode efectuar-se de forma conhecida per se, dependendo as condições da reacção em particular de se e como o grupo carboxi que participa na reacção foi activado, geralmente na presença de um solvente ou diluente adequado ou de uma sua mistura e, se necessário, na presença de um agente de condensação que, por exemplo, no caso do grupo



carboxi que participa na reacção estar presente sob a forma de um anidrido, pode também ser um agente de ligação de ácidos adequado, mediante aquecimento ou arrefecimento, por exemplo, dentro de uma gama de temperaturas de aproximadamente -30°C e aproximadamente $+150^{\circ}\text{C}$, em especial, de $+10^{\circ}\text{C}$ a $+70^{\circ}\text{C}$, de preferência da temperatura ambiente (aproximadamente $+20^{\circ}\text{C}$) a $+50^{\circ}\text{C}$, num recipiente de reacção fechado e/ou numa atmosfera de um gás inerte, por exemplo, azoto.

Os agentes de condensação usuais são, por exemplo, carbodiimidas, por exemplo, N,N'-dietil-, N,N'-diisopropil-, N,N'-diciclohexil- ou N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, compostos carbonilo adequados, por exemplo, carbonildiimidazole, ou compostos 1,2-oxazólio, por exemplo, 3'-sulfonato de 2-etil-5-fenil-1,2-oxazólio e perclorato de 2-t-butil-5-metil-isoxazólio, ou um composto acilamino adequado, por exemplo, 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina. Os agentes de condensação de ligação de ácidos são, por exemplo, carbonatos ou bicarbonatos de metais alcalinos, por exemplo, carbonato ou bicarbonato de potássio ou de sódio (geralmente juntos com um sulfato), ou bases orgânicas, tais como tri-alquil inferior aminas, geralmente impedidas estericamente, por exemplo, N,N'-diisopropil-N-etilamina.

A síntese de péptidos Merrifield atrás mencionada é especialmente adequada para uma síntese semi-automática ou completamente automática dos compostos com a sequência de amino ácidos de fórmula I, em que os fragmentos de amino ácidos e/ou de péptidos em que os grupos funcionais que não participam na reacção se encontram geralmente na forma protegida estão ligados uns aos outros por meio de agrupamentos amida sem isolamento dos fragmentos de péptidos formados. Um dos grupos funcionais, normalmente o grupo carboxi terminal presente no final do



péptido, está facultativamente ligado a um veículo polimérico adequado por meio de um membro em ponte, tal como foi descrito. Em princípio, esta variante do processo efectua-se de forma análoga à síntese usual dos péptidos, tendo-se o cuidado de, no fragmento de péptido já sintetizado que contém a fracção de veículo polimérico, a libertação, do grupo protegido, do grupo funcional que participa na reacção, em regra o grupo amino terminal, se efectuar em cada caso em condições em que os grupos protectores dos grupos funcionais que não participam na reacção são retidos.

A remoção dos grupos de protecção de carboxi-, amino-, hidroxi-, amida de ácido carboxílico-, carbamilo- e/ou guanidino efectua-se de maneira conhecida per se, por exemplo, por meio de solvólise, especialmente hidrólise (sob condições ácidas ou básicas), alcoólise, acidólise ou tratamento com uma base, ou por meio de redução, especialmente por hidrogenólise ou redução química, facultativamente por fases ou simultaneamente, sendo também possível usar métodos enzimáticos.

Assim, o t-alcoxi inferior carbonilo ou o alcoxi inferior carbonilo substituído na posição 2 com um grupo sililo orgânico ou na posição 1 com alcoxi inferior ou alquilo inferior-tio, ou difenilmetoxicarbonilo insubstituído ou substituído, pode ser convertido no carboxi livre por acidólise, por exemplo, por tratamento com um ácido adequado, tal como ácido alcano inferior carboxílico que pode conter halogéneo, por exemplo, ácido fórmico ou ácido trifluoroacético, com ou sem a adição de um composto nucleofílico, tal como fenol ou anisole. O benziloxicarbonilo substituído ou insubstituído pode ser libertado, por exemplo, por hidrogenólise, isto é, por tratamento com hidrogénio na presença de um catalisador de hidrogenação metálico, tal como um catalisador de paládio. Além disso, o benziloxicarbonilo adequadamente

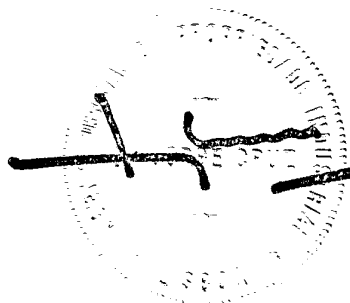


substituído, tal como o 4-nitrobenziloxicarbonilo, pode ser convertido no carboxi livre também por redução química, por exemplo, por tratamento com uma ditionite de metal alcalino, por exemplo, ditionite de sódio, ou com um metal redutor, por exemplo, zinco, ou um sal de metal redutor, tal como um sal de crômio (II), por exemplo, cloreto de crômio (II), geralmente na presença de um dador de hidrogénio que, juntamente com o metal, é capaz de produzir hidrogénio nascente, tal como um ácido, em especial um ácido carboxílico adequado, tal como um ácido alcano inferior carboxílico que é insubstituído ou substituído, por exemplo com hidroxi, por exemplo, com ácido acético, ácido fórmico, ácido glicólico, ácido difenilglicólico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido 4-cloromandélico, ou ácido tartárico, ou um álcool ou um tiol, adicionando-se de preferência água. Os grupos 2,2-dialiletotoxicarbonilo ou 2-(9-fluorenil)-etoxicarbonilo podem ser clivados em condições básicas suaves, por exemplo, por tratamento com piperidina. Por tratamento com um sal redutor ou com um sal metálico, tal como atrás foi descrito, também é possível converter 2-halo-alcoxi inferior carbonilo (facultativamente após conversão de um grupo 2-bromo-alcoxi inferior carbonilo num grupo 2-iodo-alcoxi inferior carbonilo correspondente) ou aróilmetoxicarbonilo no carboxi livre, sendo possível clivar o aróilmetoxicarbonilo também por tratamento com um reagente nucleofílico, de preferência formador de sal, tal como tiofenolato de sódio ou iodeto de sódio. O 2-sililetotoxicarbonilo substituído também pode ser convertido no carboxi livre por tratamento com um sal de ácido hidrofluórico fornecendo um anião de fluoreto, tal como um fluoreto de metal alcalino, por exemplo, fluoreto de sódio ou de potássio, na presença de um poliéter macrocíclico ("crown ether"), ou com um fluoreto de uma base quaternária orgânica, tal como fluoreto de tetra-alquil inferior amónio ou fluoreto de tri-alquil inferior amónio, por exemplo fluoreto de tetraetilamónio



ou fluoreto de tetrabutilamônio na presença de um solvente polar aprótico, tal como sulfóxido de dimetilo ou N,N-dimetilacetamida.

Um grupo amino protegido é libertado de maneira conhecida per se e, conforme a natureza dos grupos protectores, por vários métodos, mas de preferência por solvólise ou redução. O 2-halo-alcoxi inferior carbonilamino (facultativamente após conversão de um grupo 2-bromo-alcoxi inferior carbonilamino num grupo 2-iodo-alcoxi inferior carbonilamino), o aróilmetoxicarbonilamino ou o 4-nitrobenziloxicarbonilamino podem ser clivados, por exemplo, por tratamento com um agente de redução químico adequado, tal como o zinco, em presença de um ácido carboxílico adequado, tal como o ácido acético aquoso. O aróilmetoxicarbonilamino também pode ser clivado por tratamento com um reagente nucleofílico, de preferência formador de sal, tal como o tiofenolato de sódio, e o 4-nitrobenziloxicarbonilamino também por tratamento com uma dititionite de metal alcalino, por exemplo, dititionite de sódio. O difenilmetoxicarbonilamino insubstituído ou substituído, o t-alcoxi inferior carbonilamino ou o 2-sililetoxicarbonilamino tri-substituído podem ser clivados por tratamento com um ácido adequado, tal como o ácido alcano inferior carboxílico que é insubstituído ou substituído, por exemplo, com halogéneo, tal como flúor, por exemplo, ácido fórmico ou ácido trifluoroacético, e 2,2-diariletoxicarbonilamino, tal como 2,2-di-(4-nitrofenil)-etoxicarbonilamino, e também 2-(9-fluorofenil)-etoxicarbonilamino, por tratamento com uma base adequada, tal como uma amina alifática, de preferência secundária, por exemplo, piperidina. O grupo amino pode ser libertado do benziloxicarbonilamino insubstituído ou substituído, por exemplo, por hidrogenólise, isto é, por tratamento com hidrogénio na presença de um catalisador de hidrogenação adequado, tal como um catalisador de paládio, do triarilmetilamino ou formilamino insubstituído ou substituído, por exemplo, por tratamento com um ácido, tal



como um ácido mineral, por exemplo, ácido clorídrico, ou um ácido orgânico, por exemplo, ácido fórmico, acético ou trifluoroacético, na presença ou na ausência de água, e de um grupo silylamino orgânico, por exemplo, por hidrólise ou alcoólise. Um grupo amino protegido por 2-haloacetilo, por exemplo, 2-cloroacetilo, pode ser libertado, por exemplo, por tratamento com tio-ureia na presença de uma base, ou com um sal de tiolato, tal como um tiolato de metal alcalino, de tio-ureia, e por subsequente solvólise, tal como alcoólise ou hidrólise do produto de condensação resultante. Um grupo amino protegido com silyloetoxicarbonilo 2-substituído também pode ser convertido no grupo amino livre por tratamento com um sal de ácido hidrofluórico fornecendo aniões de fluoreto, tal como atrás foi descrito em relação à libertação de um grupo carboxi protegido correspondente.

O amino protegido sob a forma de um grupo azido pode ser convertido no amino livre, por exemplo, por redução, por exemplo, por hidrogenação catalítica, com hidrogénio na presença de um catalisador de hidrogenação, tal como óxido de platina, paládio ou níquel de Raney, ou alternativamente por tratamento com zinco na presença de um ácido, tal como o ácido acético. A hidrogenação catalítica pode efectuar-se, de preferência, num solvente inerte, tal como um hidrocarboneto hydrogenado, por exemplo clorato de metileno, ou alternativamente em água ou numa mistura de água e de um solvente orgânico, tal como um álcool ou dioxano, de aproximadamente 20°C a 25°C, ou alternativamente mediante aquecimento ou arrefecimento.

Um grupo hidroxil protegido com um grupo acilo adequado, um grupo silylo orgânico ou 1-fenil-alquilo inferior insubstituído ou substituído pode ser libertado analogamente a um grupo amino protegido correspondente. Um grupo hidroxil protegido com

2,2-dicloroacetil pode ser libertado, por exemplo, por hidrólise básica, e um grupo hidroxil esterificado por t-alquilo inferior, por exemplo, t-butilo, ou por um radical de hidrocarboneto 2-oxa- ou 2-tia-alifático ou -cíclicoalifático pode ser libertado por acidólise, por exemplo, por tratamento com um ácido mineral ou com um ácido carboxílico forte, por exemplo, ácido trifluoroacético.

Um grupo amida de ácido carboxílico protegido com 9-xantenilo pode ser libertado, por exemplo, por tratamento com brometo de hidrogénio em ácido glacial acético ou com fluoreto de hidrogénio na presença de anisole. Um grupo amida de ácido carboxílico protegido com mono-, di- ou tri-arilmetilo pode ser libertado, por exemplo, por tratamento com fluoreto de hidrogénio na presença de anisole; além disso, um grupo protector de difenilmetilo pode ser removido, por exemplo, por hidrogenólise na presença de um catalisador de paládio sobre carbono, e um grupo protector de di-(4-metoxifenil)-metilo ou um grupo protector de 2,4,6-trimetoxibenzilo pode ser removido, por exemplo, por tratamento com ácido trifluoroacético.

Os grupos guanidino protegidos com grupos sulfonilo orgânicos, tais como 4-metilfenilsulfonilguanidino ou 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanilsulfonilguanidino podem ser libertados, por exemplo, por tratamento com um ácido adequado, tal como o ácido trifluoroacético.

Um grupo funcional protegido, em especial um grupo carboxil correspondente em que o grupo protector actua simultaneamente como material servindo de veículo na já mencionada síntese de péptidos Merrifield, pode ser clivado de maneira conhecida per se, por exemplo, tal como atrás foi descrito. Um grupo carboxil correspondentemente esterificado que é ligado ao material

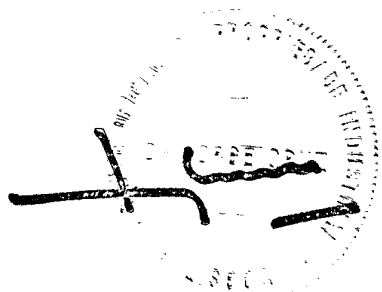


polimérico que serve de veículo através de um membro em ponte adequado, é clivado de acordo com a natureza do membro em ponte. Por exemplo, um grupo carboxi ligado a um material polimérico que serve de veículo por meio de um agrupamento ester com um membro benzílico em ponte activado, por exemplo, um grupo 4-metoxiben-ziloxicarbonilo, em que o átomo de carbono do grupo metoxi é ligado, por exemplo, a um radical fenilo da resina de poliesti-reno de fraca ligação cruzada com divinilbenzeno, pode ser libertada analogamente aos grupos benziloxicarbonilo insubsti-tuídos ou substituídos atrás mencionados, por exemplo, por tratamento com um ácido adequado, tal como o ácido trifluoro-acético.

Caso se deseje, se se encontrarem presentes vários grupos funcionais protegidos, os grupos protectores podem ser seleccionados de forma a que mais do que um desses grupos protec-tores possa ser removido ao mesmo tempo, por exemplo, por acidó-lise, por exemplo por tratamento com ácido trifluoroacético ou ácido fórmico, ou por redução, por exemplo por tratamento com zinco e ácido acético, ou com hidrogénio e com um catalisador de hidrogenação, por exemplo, com um catalisador de paládio sobre carbono.

Processo b) As células hospedeiras transformadas usadas para a manufactura dos polipéptideos do invento são produzidas do modo a seguir indicado:

- produzindo uma sequência de DNA que codifica um polipép-tido do invento,
- produzindo um vector híbrido contendo o referido DNA, e
- transformando uma estirpe hospedeira adequada com o referido vector híbrido.



O DNA que codifica um polipéptido do invento é o DNA cromossômico correspondente isolado a partir de um banco de genes humanos por processos conhecidos, o cDNA isolado pela via mRNA ou o DNA sintético correspondente. Este último é produzido de acordo com métodos geralmente conhecidos, por exemplo de acordo com o método descrito por S.A. Narang [Tetrahedron 32, 3 (1938)], ou o método descrito no pedido de patente europeu nº146785, usando especialmente máquinas de síntese de DNA que se obtêm no comércio.

Um DNA correspondente que codifica PCATFF tem a seguinte sequência:

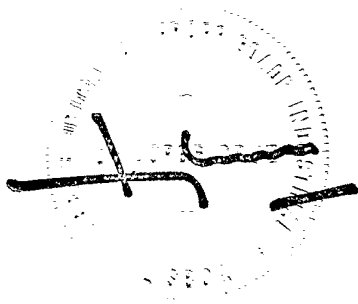
Z₁-Y₁₃-Y₁-Y₁₅-Y₁₄-Y₂-Y₁₆-Y₁-Y₁₁-Y₇-Y₁₆-Y₁₆-Y₁₅-Y₁-Y₄-Y₁₅-Y₁-Y₉-Y₁₁-Y₁₆
 -Y₇-Y₄-Y₇-Y₁-Y₂-Y₁₁-Y₁₁-Y₁₁-Y₁-Y₁-Y₁₁-Y₃-Y₆-Y₄-Y₅-Y₃-Y₆-Y₁₃-Y₁₂-Y₁-Y₁₆
 -Y₇-Y₁₁-Y₇-Y₆-Y₇-Y₆-Y₇-Y₂-Y₇-Y₈-Y₁₆-Y₁₆-Y₁₁-Y₄-Y₁₆-Y₁₅-Y₂-Y₁₆-Y₁₇-Z₂

enquanto um DNA que codifica PCBRPATFF tem a seguinte sequência

Z₁-Y₁₃-Y₁-Y₁₅-Y₁₄-Y₂-Y₁₆-Y₁-Y₁₁-Y₇-Y₁₆-Y₁₆-Y₁₅-Y₁-Y₄-Y₁₅-Y₁-Y₉-Y₁₁-Y₁₆
 -Y₇-Y₄-Y₇-Y₁-Y₂-Y₁₁-Y₁₁-Y₁₁-Y₁-Y₁-Y₁₁-Y₃-Y₆-Y₄-Y₅-Y₃-Y₆-Y₁₃-Y₁₂-Y₁-Y₁₆
 -Y₇-Y₁₁-Y₇-Y₆-Y₇-Y₆-Y₇-Y₂-Y₇-Y₈-Y₁₆-Y₂-Y₁₀-Y₁₀-Y₁-Y₆-Y₁₇-Z₂,

em que

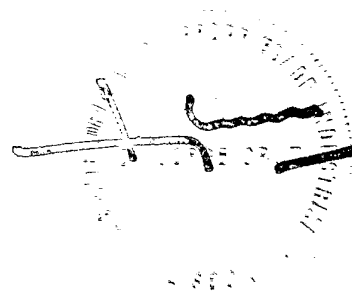
- Y₁ codifica a alanina (Ala) e é GCT, GCC, GCA ou GCG,
- Y₂ codifica a arginina (Arg) e é CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG,



- Y₃ codifica a valina (Val) e é GTT, GTC, GTA ou GTG,
 - Y₄ codifica o ácido aspártico (Asp) e é GAT ou GAC,
 - Y₅ codifica a tirosina (Tir) e é TAT ou TAC,
 - Y₆ codifica a glutamina (Gln) e é CAA ou CAG,
 - Y₇ codifica o ácido glutâmico (Glu) e é GAA ou GAG,
 - Y₈ codifica a glicina (Gli) e é GGT, GGC, GGA ou GGG,
 - Y₉ codifica a treonina (Tre) e é ACT, ACC, ACA ou ACB,
 - Y₁₀ codifica a isoleucina (Ile) e é ATT, ATC ou ATA,
 - Y₁₁ codifica a leucina (Leu) e é TTA, TTG, CTT, CTC, CTA ou CTG,
 - Y₁₂ codifica a lisina (Lis) e é AAA ou AAG,
 - Y₁₃ codifica a metionina (Met) e é ATG,
 - Y₁₄ codifica a fenilalanina (Fen) e é TTT ou TTC,
 - Y₁₅ codifica a prolina (Pro) e é CCT, CCC, CCA ou CCB,
 - Y₁₆ codifica a serina (Ser) e é TCT, TCC, TCA, TCB, AGT ou AGC,
 - Y₁₇ representa TAA, TAG ou TGA (codão stop), e
- Z₁ e Z₂ são regiões flanqueadoras de DNA contendo 5 a 100, especialmente 5 a 15, nucleótidos que contêm cada um uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição.

O invento refere-se especialmente às sequências de DNA que codificam PCATFP e PCBRPATFP contendo tripletos preferidos pela E. coli ou S. cerevisiae.

Um DNA preferido codificando PCATFP tem a seguinte sequência (em que são indicados os locais de clivagem da enzima de restrição)



5' MetAlaProPheArgSerAlaLeuGluSerSerProAlaAspProAlaThr
CTGGAATTCATGGCTCCGTTCCGTTCTGCTCTGGAATCTTCTCCGGCTACCCGGCTACC
GACCTTAAGTACCGAGGCAAGGCAAGACGAGACCTTAGAAGAGGCCGACTGGGCCGATGG
3' -----

EcoRI

LeuSerGluAspGluAlaArgLeuLeuLeuAlaAlaLeuValGlnAspTyrValGlnMet
CTGTCTGAAGACGAAGCTCGTCTGCTGCTAGCTGCTCTGGTTCAGGACTACGTTCAATG
GACAGACTTCTGCTTCGAGCAGACGACGATCGACGAGACCAAGTCTGATGCAAGTCTAC

NheI

LysAlaSerGluLeuGluGlnGluGlnGluArgGluGlySerSerLeuAspSerProArg
AAAGCTTCTGAACTGGAACAGGAACAGGAACGTGAAGTTCTTCTCTGGACTCTCCGCGT
TTTCAAGACTTGACCTTGCCTTGCCTTGCCTTCCAAGAAGAGACCTGAGAGGGCGCA

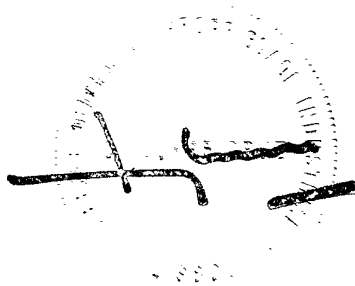
SerNON 3'
TCTTAGGATCCTG
AGAATCCTAGGAC
-----5'

(III)

BamHI

O oligonucleótido de fórmula (III) é preparado, por exemplo, de acordo com o processo descrito no pedido de patente europeu nº168342, sintetizando quimicamente as sequências parciais sublinhadas na fórmula III, tratando com quinase, processando de modo a obter-se duplexes usando DNA polimerase e os quatro trifosfatos de nucleosídeos e ligando por meio dos locais de clivagem de restrição inseridos a fim de formar o gene FCATFP.

O invento refere-se ainda a vectores de expressão contendo uma sequência de DNA que codifica FCATFP ou FCGRPATFP e regulada por uma sequência de controlo de expressão.



Os vectores de expressão do presente invento são preparados, por exemplo, inserindo uma sequência de DNA que codifica um polipéptido do invento num vector de DNA que contém uma sequência de controlo de expressão de tal modo que a sequência de controlo de expressão regule a referida sequência de DNA.

A escolha de um vector adequado baseia-se na célula hospedeira fornecida para a transformação. As células hospedeiras adequadas são, por exemplo, microrganismos, tais como leveduras, por exemplo, Saccharomyces cerevisiae, e estirpes bacterianas, em especial estirpes de Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas, Haemophilus, Streptococcus, e outros, e também células de organismos superiores, em especial linhas de células humanas ou animais estabelecidas.

São adequados, em princípio, todos os vectores capazes de replicar e exprimir na hospedeira seleccionada as sequências de DNA heterólogas que codificam os polipéptidos do invento.

Constituem exemplos de vectores que são adequados para a expressão de um gene numa estirpe de E.coli os bacteriófagos, por exemplo, derivados do bacteriófago lambda, ou plasmídeos, tais como, em particular, o plasmídeo colE1 e os seus derivados, por exemplo, pBR322. Os vectores adequados contêm um replicão intacto e um gene marcador que torna possível a selecção e a identificação dos microrganismos transformados pelos plasmídeos de expressão por meio de uma característica fenotípica. Os genes marcadores adequados conferem, por exemplo, ao microrganismo, resistência aos metais pesados, antibióticos e outros. Além disso, os vectores preferidos contêm, para além do replicão e das regiões de genes marcadores, sequências de reconhecimento para as endonucleases de restrição, de tal forma que a sequência de DNA

que codifica o polipéptido do invento e facultativamente a sequência de controlo de expressão podem ser inseridas nestes locais. O plasmídeo pBR322 contém um replicão intacto e genes marcadores (tet^R e amp^R) conferindo resistência à tetraciclina e à ampicilina.

Podem usar-se várias sequências de controlo de expressão para regular a expressão do polipéptido. Usam-se particularmente sequências de controlo de expressão de genes fortemente expressos de células hospedeiras a ser transformadas. Quando se usa pBR322 como vector híbrido e E. coli como microrganismo hospedeiro as sequências de controlo de expressão adequadas (que, entre outros, contêm o promotor e o local de ligação cromossómico) são, por exemplo, as do operão lactose, do operão triptofano, do operão arabinose e outras, e do gene β -lactamase, as sequências correspondentes do gene do fago lambda N, do gene da proteína da camada do fago fd e outros. Enquanto o promotor do gene β -lactamase (β -lac-gene) já está contido no plasmídeo BR322, as outras sequências de controlo de expressão têm de ser inseridas no plasmídeo.

Os vectores adequados para a replicação e expressão na levedura contêm uma origem de replicação de levedura e um marcador genético selectivo para a levedura. Os vectores híbridos que contêm uma origem de replicação de levedura, por exemplo, o segmento cromossómico que replica autonomamente (ars) são retidos extra-cromossomicamente dentro da célula de levedura após transformação e são replicados autonomamente durante a mitose. Do mesmo modo, podem ser usados os vectores híbridos que contêm sequências homólogas à do DNA do plasmídeo 2μ da levedura. Estes vectores híbridos são integrados por recombinação dos plasmídeos 2μ já presentes dentro da célula, ou replicar autonomamente. As sequências 2μ são particularmente adequadas para plasmídeos com



uma elevada frequência de transformação e permitem um elevado número de cópias. Os genes marcadores adequados para a levedura são em especial aqueles que transmitem resistência antibiótica ao hospedeiro ou, no caso de mutantes de levedura auxotróficos, genes que complementam a deficiência do hospedeiro. Os genes correspondentes transmitem, por exemplo, resistência ao antibiótico cicloheximida, ou fornecem fototrofia num mutante de levedura auxotrófico, por exemplo, o gene URA3, LEU2, HIS3, ou em especial, o gene TRP1. De preferência, os vectores híbridos da levedura contêm um replicação de origem e um gene marcador para um hospedeiro bacteriano, em particular, a E. coli, de forma a que a construção e a clonação dos vectores híbridos e dos seus precursores possa efectuar-se num hospedeiro bacteriano. As sequências de controlo de expressão adequadas para a expressão na levedura são, por exemplo, as do gene TRP1, ADH1 ou PHO5 e também dos promotores envolvidos na degradação glicolítica, por exemplo o promotor PGK e o promotor GADPH.

O invento refere-se especialmente a vectores de expressão capazes de replicação e de selecção fenotípica que contêm uma sequência de controlo de expressão e uma sequência de DNA que codifica um dos polipeptídeos do invento, em que a referida sequência de DNA, juntamente com o sinal de início de transcrição, o sinal de terminação, o sinal de início de translação e o sinal stop no referido plasmídeo de expressão, está arranjada de tal modo, com a regulação da referida sequência de controlo de expressão, que os polipéptídeos do invento se encontram expressos numa célula hospedeira transformada com o referido plasmídeo de expressão.

A fim de se obter uma expressão eficaz, o gene deve ser arranjado correctamente ("em fase") com a sequência de controlo de expressão. É vantajoso ligar a sequência de controlo de

expressão na região situada entre a origem mRNA principal e o ATG de uma sequência que codifica o gene que está ligado naturalmente à sequência de controlo de expressão (por exemplo a sequência que codifica β -lac quando se usa o promotor β -lac), com o gene, que de preferência traz com ele o seu próprio sinal de início de translação e o sinal stop de translação (por exemplo TAG). Fica assim assegurada uma translação eficaz.

Por exemplo, um vector, especialmente o pBR322, é clivado com uma endonuclease de restrição e, facultativamente após a modificação do vector linearizado resultante, é inserida uma sequência de controlo de expressão com extremidades de restrição correspondentes. A sequência de controlo de expressão contém, na extremidade 3' (na direcção da translação), a sequência de reconhecimento de uma endonuclease de restrição, de forma a que o vector que já contém a sequência de controlo de expressão possa ser digerido com a referida enzima de restrição, e o gene que codifica um dos polipeptídeos do invento e está provido de extremidades compatíveis possa ser inserido. O resultado é uma mistura de dois plasmídeos híbridos, que contém o gene na orientação correcta e incorrecta, respectivamente. É vantajoso clivar o vector contendo já a sequência de controlo de expressão com uma segunda endonuclease de restrição dentro do vector DNA e inserir no fragmento de vector resultante o gene que codifica um dos polipeptídeos do invento provido de extremidades correctas. Todas as operações sobre o vector efectuam-se, de preferência, de maneira tal que a função de replicação e de pelo menos um gene marcador não fique prejudicada.

A construção do vector pode também conter uma sequência de sinal que seja adicionada de forma operativa à sequência de controlo de expressão e possua o esquema de leitura correcto em relação ao gene que codifica o polipeptídeo do invento. As



sequências de sinal adequadas são, por exemplo, as sequências de sinal OmpA, Ipp e β -lac quando se usa E. coli como microrganismo hospedeiro e as sequências de sinal invertase, factor- α e PH05 quando se usa como microrganismo hospedeiro S. cerevisiae.

A transformação das células hospedeiras com os plasmídeos de expressão do invento efectua-se de acordo com processos conhecidos. O isolamento das células hospedeiras transformadas efectua-se vantajosamente a partir de um meio nutriente selectivo a que se adicionou o biocida contra o qual o gene marcador contido no plasmídeo de expressão confere resistência.

Se, como é preferido, os plasmídeos de expressão contêm o gene amp^R , adiciona-se por consequência ampicilina ao meio nutriente. As células que não contêm o plasmídeo de expressão são destruídas num tal meio.

O invento refere-se também às células hospedeiras transformadas susceptíveis de serem obtidas da maneira mencionada.

A cultura das células hospedeiras transformadas do invento de acordo com o processo b) efectua-se de modo conhecido per se. Por exemplo, podem usar-se várias fontes de carbono para fazer a cultura dos microrganismos hospedeiros transformados do invento. Como exemplos das fontes de carbono preferidas temos os carbo-hidratos assimiláveis, tais como a glucose, a maltose, o manitol ou a lactose, ou um acetato, que pode ser utilizado quer sozinho, quer em misturas adequadas. Constituem fontes de azoto adequadas, por exemplo, os amino ácidos, tais como os ácidos caseínicos, os peptídeos e as proteínas e os seus produtos de degradação, tais como a triptona, a peptona ou os extractos de carne; e também os extractos de levedura, os extractos de malta

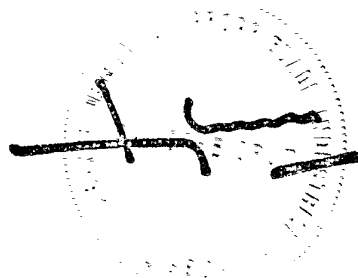


e ainda os sais de amônio, por exemplo, cloreto, sulfato ou nitrato de amônio que podem ser usados sozinhos ou em misturas adequadas. Os sais inorgânicos que também podem ser usados são, por exemplo, os sulfatos, cloretos, fosfatos e carbonatos de sódio, potássio, magnésio e cálcio.

Além disso, o meio contém substâncias promotoras do crescimento, tais como elementos residuais, por exemplo, ferro, zinco, manganésio e outros, e, de preferência, substâncias que exercem uma pressão na selecção e impedem o crescimento de células que perderam o seu plasmídeo de expressão. Assim, por exemplo, adiciona-se ampicilina ao meio quando o plasmídeo de expressão contém um gene amp^R . Uma tal adição de substâncias antibioticamente activas também tem o efeito de destruir organismos antibioticamente sensíveis contaminantes.

A cultura efectua-se de acordo com processos que são conhecidos per se. As condições de cultura, tais como a temperatura, o valor do pH do meio e o tempo de fermentação, são seleccionados de modo a obterem-se titulações máximas de polipeptídeos. Assim, uma estirpe de E. coli ou de uma levedura cultivam-se, de preferência, em condições aeróbicas, em culturas submersas, sacudindo ou agitando a uma temperatura de aproximadamente 20 a 40°C, de preferência, de aproximadamente 30°C, e com um valor do pH de 4 a 8, de preferência um pH 7, durante aproximadamente 4 a 20 horas, de preferência 8 a 20 horas.

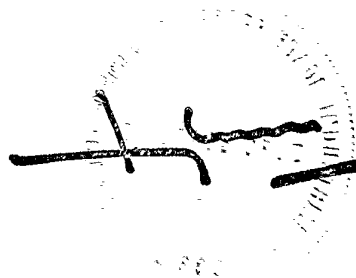
Quando a densidade das células atingiu um valor adequado, dá-se a cultura por terminada e o polipeptídeo do invento é libertado das células do microorganismo. Para tal, as células são destruídas, por exemplo, por tratamento com um detergente, tal como o SDS ou Triton, ou são lisadas com uma lisozima ou uma enzima actuando de forma semelhante. Alternativamente, ou



adicionalmente, podem utilizar-se forças mecânicas, tais como forças de corte (por exemplo, prensa-X, prensa francesa, moinho-Dyno) ou agitação com contas de vidro ou óxido de alumínio, ou congelamento alternado, por exemplo, em azoto líquido, e descongelamento, por exemplo, de 30°C a 40°C, e ultra-sons, para fraccionar as células. A mistura resultante contendo proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes celulares é enriquecida, após centrifugação, de maneira conhecida per se em relação ao teor de proteínas. Assim, por exemplo, os constituintes não proteicos são, na maior parte dos casos, removidos por meio de tratamento com polietilenoimina e as proteínas, incluindo os polipeptídeos do invento, são precipitadas, por exemplo, saturando a solução com sulfato de amónio ou com outros sais. As proteínas bacterianas podem também ser precipitadas por meio de acidificação com ácido acético (por exemplo 0,1%, pH 4-5). Outros passos de purificação incluem, por exemplo, processos cromatográficos, tais como cromatografia de permuta de iões, cromatografia de permeação de gel, cromatografia de partição, CLAP, CLAP de fase invertida e outros. Por exemplo, a separação dos constituintes da mistura é feita por diálise, de acordo com a carga, por meio de electroforese a gel ou electroforese isenta de veículos, de acordo com a dimensão molecular por meio de uma coluna Sephadex adequada, por cromatografia por afinidade, por exemplo, com anticorpos, em especial anticorpos monoclonais, ou com trombina acoplada a um veículo adequado à cromatografia por afinidade, ou por outros processos conhecidos.

Por exemplo, o isolamento de um polipeptídeo do invento expressado pode compreender os seguintes passos:

Separação das células da solução de cultura por centrifugação; produção de um extracto em bruto através da destruição das células, por exemplo, por tratamento com uma enzima que as



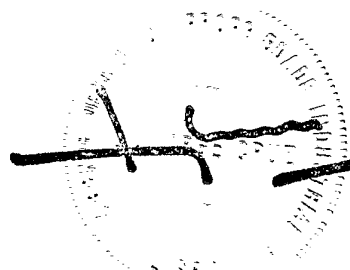
vai lisar e/ou congelamento/descongelamento alternado; remoção dos constituintes insolúveis por centrifugação; precipitação do DNA pela adição de polietilenoimina; precipitação das proteínas por meio de sulfato de amônio; cromatografia de permuta de iões e/ou CLAP de fase invertida; remoção dos sais da solução resultante por meio de diálise ou por cromatografia sobre um permutador de iões adequado, por exemplo, Sephadex G25 ou Sephadex G10.

Podem usar-se testes com anticorpos adequados, por exemplo, anticorpos monoclonais que se podem obter de células de hibridoma, para detectar os polipeptídeos do invento.

Obtêm-se, em regra, de acordo com o processo b), peptídeos de fórmula I em que R representa hidrogénio, especialmente quando são expressados em levedura. Em certas células hospedeiras, por exemplo, E. coli, uma acetilação N-terminal pode, no entanto, ocorrer, daí resultando que se obtenham peptídeos de fórmula I em que R representa acetilo.

Nos peptídeos de fórmula I susceptíveis de serem obtidos de acordo com o invento com um radical metionina contendo um grupo sulfóxido, esse grupo é convertido no grupo tio por redução de uma maneira conhecida per se. Para tal, usam-se agentes redutores adequados, de preferência sais de iodeto, tal como iodeto de amônio, geralmente na presença de um diluente, podendo remover-se o iodo resultante, por exemplo, por tratamento com ácido ascórbico.

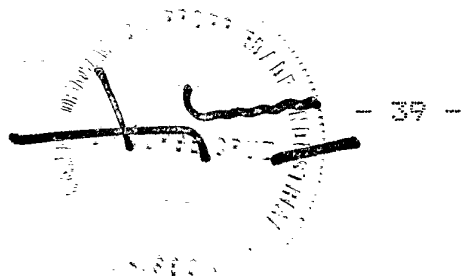
Os sais dos compostos de fórmula I podem ser manufacturados de maneira conhecida per se. Por exemplo, podem formar-se compostos de fórmula I contendo mais grupos ácidos do que básicos, por exemplo, por tratamento com compostos metálicos, tais como sais de metais alcalinos de ácidos carboxílicos orgânicos



adequados, por exemplo, o sal de sódio do ácido α -etilcapróico, ou com sais de metais alcalinos ou alcalino terrosos inorgânicos, por exemplo, bicarbonato de sódio, ou com amônia, ou com uma amina orgânica adequada, usando-se de preferência quantidades estequiométricas ou apenas um pequeno excesso do agente formador de sal. Os sais de adição de ácidos dos compostos de fórmula I são obtidos da maneira usual, por exemplo, por tratamento com um ácido ou com um reagente de permuta de aniões adequado. Os sais internos dos compostos de fórmula I que contêm um grupo ácido livre ou um grupo básico livre, podem formar-se, por exemplo, neutralizando os sais, tais como os sais de adição de ácidos até ao ponto isoeléctrico, por exemplo, com bases fracas, ou por tratamento com permutadores de iões líquidos.

Os sais podem ser convertidos da maneira usual em compostos livres; os sais metálicos e de amónio podem ser convertidos nos compostos livres, por exemplo, por tratamento com ácidos adequados e com sais de adição de ácidos, por exemplo, por tratamento com um agente básico adequado.

Os peptídeos de fórmula I possuem valiosas propriedades farmacológicas. Se, por exemplo, as células calvarianas de embriões de frangos ou de ratos recém-nascidos forem tratadas in vitro com peptídeos de fórmula I, a estimulação da multiplicação celular pode ser determinada por meio do aumento da incorporação de timidina rotulada com trítio no DNA. Esta estimulação pode ser obtida com concentrações de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nmol/l, e é mais pronunciada com concentrações de aproximadamente 100 nmol/l, sendo possível determinar o efeito da presença ou ausência do soro no meio de cultura. A acção estimuladora dos peptídeos de fórmula I é específica dos osteoblastos; por exemplo, os fibroblastos da pele dos ratos não reagem. Ao contrário da calcitonina ou do polipeptídeo relacionado com o



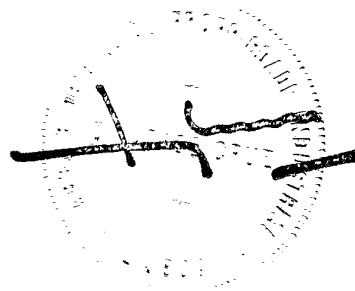
gene da calcitonina, os peptídeos de fórmula I não evitam a reabsorção óssea, o que pode ser demonstrado in vitro no sistema calvariano dos murganhos.

Em consequência destas propriedades farmacológicas, os peptídeos de fórmula I podem ser usados, por exemplo, no tratamento de doenças relacionadas com a degenerescência óssea (osteopenia), tais como a osteoporose, a osteoartrite, a osteoartrose, ou a doença de Sudeck, sendo administradas doses de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/dia a animais de sangue quente com um peso corporal aproximado de 70 kg.

O invento refere-se, portanto, também a um método para tratar doenças envolvendo a degenerescência óssea em animais de sangue quente, método esse que compreende a administração a um animal de sangue quente que tenha a referida doença uma dose eficaz de um peptídeo de fórmula I ou de um seu sal farmacologicamente aceitável.

Além disso, os peptídeos de fórmula I podem ser usados na manufactura de anticorpos de diagnóstico dos carcinomas medulares da tiróide.

O invento refere-se também a preparações farmacêuticas contendo, como ingrediente activo uma dose eficaz, em especial uma dose eficaz para o tratamento das doenças atrás mencionadas, de um dos compostos do invento ou de um seu sal, de preferência juntamente com um veículo, sendo a proporção em que este se encontra geralmente superior a 50% em peso. Estas são, em particular, preparações adequadas para administração intranasal ou parentérica, por exemplo, subcutânea, intramuscular ou intravenosa, a animais de sangue quente, por exemplo a seres humanos, dependendo a dosagem do ingrediente activo da espécie, do peso



corporal, da idade e do estado do individuo, da doença a ser tratada e do modo de administração.

As novas preparações farmacêuticas para administração parentérica contém, numa forma pronta a ser usada, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10% em peso, de preferência de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1% em peso, do ingrediente activo. As preparações farmacêuticas de acordo com o invento podem apresentar-se, por exemplo, sob a forma de unidades de dosagem, por exemplo, sob a forma de ampolas.

Podem ser preparadas antes da utilização, de preferência, soluções do ingrediente activo e também suspensões, em especial soluções ou suspensões aquosas isotónicas, e estas, por exemplo no caso de preparações liofilizadas contendo o ingrediente activo sozinho ou juntamente com um veículo, por exemplo, o manitol. São especialmente adequadas para administração intranasal as suspensões em óleo. As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e podem conter aditivos, por exemplo, conservantes, estabilizantes, molhantes e/ou emulsificantes, solubilizantes, sais para regular a pressão osmótica e/ou tampões, e também substâncias aumentando a viscosidade, tais como carboximetilcelulose de sódio, carboximetilcelulose, dextrano, polivinilpirrolidono ou gelatina. Podem ser manufacturadas de maneira conhecida per se, por exemplo, por meio de processos de dissolução e de liofilização convencionais.

As suspensões em óleo contém, como componente oleoso os óleos vegetais sintéticos ou semi-sintéticos geralmente usados nas injeções. Podem mencionar-se neste caso, em especial, os ésteres de ácidos gordos líquidos que contém como componente ácido um ácido gordo de cadeia longa contendo cerca de 8 a cerca de 22 átomos de carbono, tal como, por exemplo, ácido láurico,

Ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico ou ácidos insaturados correspondentes, por exemplo, ácido oleico, ácido eláidico, ácido erúxico, ácido brassídico ou ácido linoleico. O componente álcool contém, geralmente, até a um máximo de 7 átomos de carbono inclusive e é um álcool mono- ou poli-hídrico, por exemplo, metanol, etanol, propanol, butanol ou pentanol ou os seus isómeros, mas especialmente glicol ou glicerol. Podem, por isso, mencionar-se a título de exemplo, como ésteres de ácidos gordos: o oleato de etilo, mistirato de isopropilo, palmitato de isopropilo, trioleato de polioxietilenoglicerol (por exemplo, "Labrafil M 2735", manufacturado por Gattefossé, Paris), triglicéridos de ácidos gordos saturados com uma cadeia longa contendo 8 a 12 átomos de carbono (por exemplo, "Miglyol 812", manufacturado por Chemische Werke, Witten, Ruhr, Alemanha), e também óleos vegetais, tais como óleo de semente de algodão, óleo de amêndoa, azeite, óleo de ricino, óleo de sésamo, óleo de soja ou óleo de amendoim.

A manufactura das preparações injectáveis efectua-se da maneira usual, sob condições antimicrobianas, tal como sucede também com a sua introdução em ampolas ou frascos e com a selagem desses recipientes.

O invento refere-se igualmente à utilização dos compostos de fórmula I como ingredientes farmacologicamente activos ou para a manufactura de preparações farmacêuticas, em especial para o tratamento de doenças que implicam a degenerescência óssea, sendo administradas, de preferência, doses diárias de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg.

Os radicais orgânicos e os compostos referidos até aqui como "inferiores" contêm até 7 inclusivê, de preferência até 4 inclusivê, átomos de carbono.

Os exemplos que se seguem ilustram o invento. As temperaturas são referidas em graus centígrados.

Exemplo 1

1.1 O Fmoc-peptídeo/resina que se pode obter de acordo com o processo abaixo descrito é submetido num aparelho de síntese de peptídeos completamente automático às seguintes reacções e operações de lavagem, usando-se aproximadamente 30 ml de líquido de lavagem de cada vez e agitando-se regularmente o recipiente da reacção; os passos da reacção, salvo indicação em contrário, efectuam-se à temperatura ambiente:

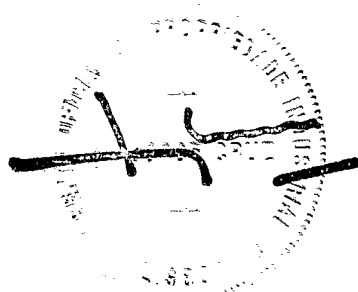
- lavagem simples do material de partida Fmoc-peptídeo/resina com isopropanol durante 0,8 minutos;

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- oito tratamentos, com a duração de 1,8 minutos cada um, com uma solução a 20% de piperidina em dimetilacetamida degaseificada (remoção do grupo protector de Fmoc);

- duas lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- uma lavagem simples durante 0,8 minutos com isopropanol;



- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com 1-metil-2-piperidona destilada;

- adição do primeiro reagente de acoplamento, que foi preparado entretanto da maneira que se segue: dissolvem-se 2,7 mmol de Fmoc-L-alanina em 6,75 ml de uma mistura 0,4 molar de 1-hidroxi-1H-benzotriazole em 1-metil-2-piperidona, e adicionam-se 6,48 ml de uma solução 0,5 molar de diisopropilcarbodiimida em 1-metil-2-piperidona. A mistura da reação é mantida à temperatura ambiente durante aproximadamente 40 minutos e depois usada nesta forma. A reação de acoplamento em si mesma leva 40 minutos e a mistura da reação é mantida a 50°;

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com 1-metil-2-piperidona destilada;

- adição do segundo reagente de acoplamento que foi preparado entretanto e tem a mesma composição do primeiro, tendo sido preparado da mesma maneira; a reação de acoplamento efectua-se a 50°C e leva 30 minutos (pode obter-se com a segunda reação de acoplamento uma reação quase completa);

- uma lavagem simples com a duração de 0,4 minutos com dimetilacetamida degaseificada, sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- um tratamento simples com a duração de 4,5 minutos, com aproximadamente 30 ml de uma mistura 1:1:8 (v/v/v) de anidrido acético, piridina e dimetilacetamida (para a acetilação dos



grupos amino que ainda estão livres, sendo os compostos N-acetilados removidos no sistema de processamento subsequente);

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada, sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- uma lavagem simples com a duração de 0,8 minutos com isopropanol;

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada, sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

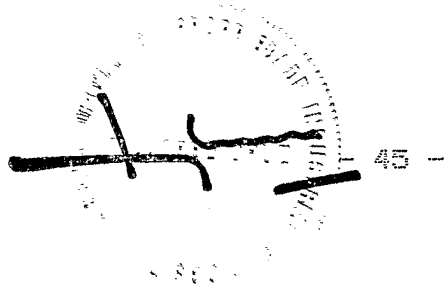
- oito tratamentos, com a duração de 1,8 minutos, com uma solução a 20% de piperidina em dimetilacetamida (remoção do grupo protector de Fmoc);

- duas lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada, sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- uma lavagem simples com a duração de 0,8 minutos com isopropanol;

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada, sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina); e

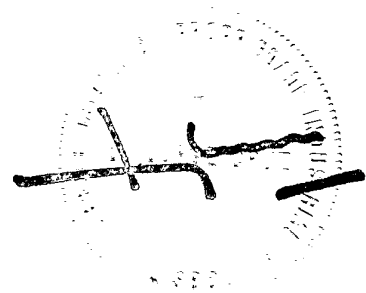
três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com 1-metil-2-piperidona destilada;



Depois de efectuados estes passos do processo, o composto peptideo/resina resultante é lavado cinco vezes com isopropanol e seco sob pressão reduzida (alto vácuo).

1.2 A fim de se remover o veículo polimérico e, caso se deseje, alguns dos grupos protectores lábeis relativamente aos ácidos, agitam-se 1,1 g do composto peptideo/resina (aproximadamente 0,1 mmol), que é obtido de acordo com o processo atrás referido, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, em 6 ml de uma mistura 98:2 (v/v) de ácido trifluoroacético (95%) e etanoditiol, filtram-se seguidamente e trata-se de novo o residuo da filtração durante um período de 5 minutos com a mesma quantidade da mistura ácido trifluoroacético/etanoditiol e filtram-se mais uma vez. O residuo da filtração é depois lavado duas vezes com 6 ml de 1,2-dicloroetano de cada vez, e duas vezes com 6 ml de trifluoroetanol de cada vez. Os filtrados combinados e os líquidos de lavagem são concentrados à temperatura ambiente sob pressão reduzida para um volume de aproximadamente 5 ml, e o peptideo em bruto é precipitado através da adição de 25 ml de uma mistura 1:1 (v/v) de éter diisopropílico e éter de petróleo (baixa ebulição). O precipitado é isolado por filtração e seco sob pressão reduzida (pressão elevada).

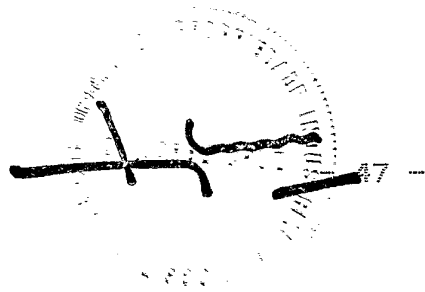
Os grupos protectores podem ser removidos completamente dissolvendo o peptideo em bruto em 5 ml de uma mistura 98:2 (v/v) de ácido trifluoroacético (95%) e etanoditiol; a solução é mantida à temperatura ambiente durante 60 minutos, e o peptideo é precipitado de novo pela adição de 25 ml de uma mistura 1:1 (v/v) de éter diisopropílico e éter de petróleo (baixa ebulição); este tratamento é repetido mais uma vez e o tempo de reacção atinge os 50 minutos. O precipitado é dissolvido em 20 ml de ácido acético aquoso a 10% e liofilizado; o peptideo em bruto é obtido sob a forma de um pó branco.



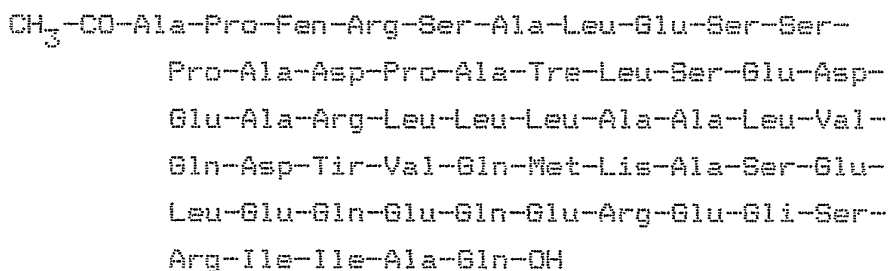
1.3 Para a redução de qualquer porção de sulfóxido de metionina que possa estar presente dissolvem-se 0,1 g do peptídeo em bruto resultante em 1 ml de ácido trifluoroacético (90%), adiciona-se uma solução de 0,015 g de iodeto de amônio em 1 ml de água e, após 10 minutos, o peptídeo é precipitado à temperatura ambiente através da adição de 6 ml de uma mistura 1:1 (v/v) de éter diisopropílico e éter de petróleo (baixa ebulição). O óleo avermelhado assim obtido é dissolvido em 2 ml de ácido acético aquoso a 10%, adicionando-se um total de 0,01 g de ácido ascórbico em porções até a solução ficar completamente incolor. A solução é submetida a uma filtração com gel, para o que se usa uma coluna de um produto de poliacrilamida com uma gama de separação de 1000 a 6000 (coluna Biogel-P6, manufacturada por Bio-Rad). A eluição efectua-se com ácido acético aquoso a 10%, e o peptídeo em bruto desejado é obtido como uma primeira fracção depois de separado por lavagem com aproximadamente 40 ml; O produto é obtido sob a forma de um pó branco por liofilização.

Partilham-se 265 mg do produto filtrado com Biogel num aparelho de partição em contra-corrente com um volume de fase de 3 ml no sistema álcool t-amilo/ácido acético/água (4:2:5; v:v:v) por 1900 etapas, começando nos recipientes 3-5. Tomam-se 2 fracções limite dos recipientes 33-39 e dos recipientes 81-90. Continua a processar-se o material obtido após concentração no vácuo e liofilização da fracção principal altamente purificada dos recipientes 40-80.

Dissolvem-se para purificação 0,065 g do peptídeo em bruto assim obtido em 6,5 ml de ácido acético aquoso a 20% e submetem-se em duas porções (2,2 ml e 4,3 ml) a cromatografia líquida de alta pressão sob as condições que se seguem: a coluna, que mede 20x250 mm, é constituída por gel de sílica, carregada com cadeias alifáticas (Nucleosil 7C18, manufacturado por

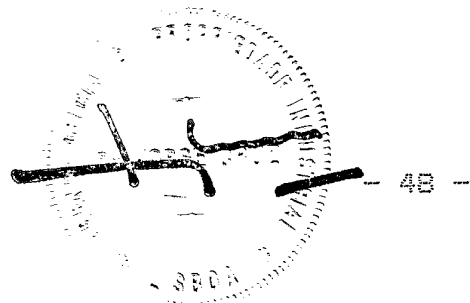


Macherey-Nagel, Dueren, República Federal da Alemanha) usando-se ácido trifluoroacético aquoso a 0,1% como eluente (A) e uma solução a 0,1% de ácido trifluoroacético em acetonitrilo como eluente (B). O gradiente linear é de 15% de B -> 45% de B em 50 minutos, 45% de B -> 60% de B em 10 minutos, 60% de B -> 100% de B em 10 minutos, a velocidade de passagem é de 18 ml/min e a detecção de raios UV de 215 nm. A fracção principal, com um tempo de retenção de aproximadamente 45 minutos, é recolhida, concentrada sob pressão reduzida (alto vácuo) e depois liofilizada. Deste modo o peptídeo PCATFF de fórmula



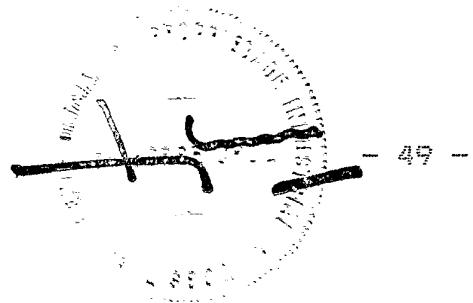
é obtido sob a forma de um pó branco.

A cromatografia líquida de alta pressão (coluna: gel de sílica, carregada com cadeias alifáticas (Nucleosil 5C18, manufacturado por Macherey-Nagel, Dueren, República Federal da Alemanha); dimensão: 4,6 x 250 mm, eluente A: ácido trifluoroacético aquoso a 0,1%, e eluente B: uma solução a 0,1% de ácido trifluoroacético em acetonitrilo; gradiente linear 0% de B 90% -> de B em 60 minutos; velocidade de passagem: 1 ml/min; detecção por raios UV: 215 nm) para o produto homogéneo assim obtido, dá um tempo de retenção de 37,8 minutos. A espectrometria de massa de desadsorção de plasma (257 Cf) fornece o peso molecular correspondente.



FAB-MS: MH^+ 6220), ponto isoelectrico: 4,2 (calculado: 4,04).

O material de partida pode ser obtido da seguinte maneira: A construção da molécula do peptideo efectua-se de acordo com a síntese de Merrifield, a partir do chamado éster Fmoc-Ser(But)-p-benziloxibenzilico-resina de poliestireno (ligação cruzada 1%) manufacturado por Novabiochem, Laeufelfingen, Suíça), em que o grupo carboxi de L-serina, de que o grupo amino é protegido por 9-fluorenil-metoxi-carbonil (Fmoc) e o grupo hidroxi é protegido por t-butilo (But), é esterificado com álcool 4-metoxibenzilico em que o átomo de carbono do grupo metoxi está ligado a um anel aromático de resina de poliestireno, 1% de ligação cruzada com divinilbenzeno, que actua simultaneamente como veículo. Para tal usa-se um aparelho de síntese peptidica completamente automático que é adequado para a remoção alternada de grupos protectores de amino, no caso presente, o grupo Fmoc, e o acoplamento dos derivados de ácido Fmoc-amino sem isolamento dos intermediários peptideo/resina que se podem obter em cada etapa. Numa primeira etapa o Fmoc-Arg(Pmc)-OH (Pmc: 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo) é acoplado com o material de partida Ser(But)/resina e em seguida os outros amino ácidos Fmoc são acoplados em várias etapas, na seguinte sequência, ao intermediário peptideo/resina que se pode obter após cada etapas: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH (o segundo grupo carboxi que não participa na reacção encontra-se sob a forma de éster t-butílico), Fmoc-Leu, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Gli-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lis(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Tir(But)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH,



Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tre(But)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Glu(OBut)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Fen-OH e Fmoc-Pro-OH.

As etapas individuais efectuam-se de acordo com o seguinte esquema, usando-se aproximadamente, em cada caso, 30 ml de líquidos de lavagem, com as operações individuais, salvo indicação em contrário e são realizados à temperatura ambiente e a reacção da mistura é regularmente agitada.

Partindo de 2 g do material de partida Fmoc-Ser(But)-/resina atrás descrito, efectuam-se as seguintes etapas do processo, repetidas para cada etapa:

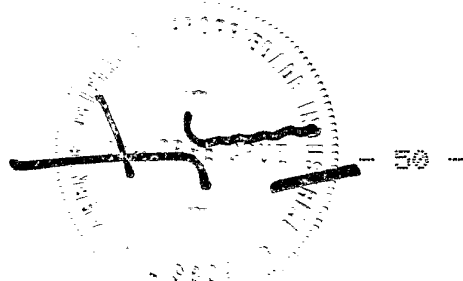
- uma lavagem simples durante 0,8 minutos com isopropanol;

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- oito tratamentos, com a duração de 1,8 minutos cada um, com uma solução a 20 de piperidina em dimetilacetamida (remoção do grupo protector de Fmoc);

- duas lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- uma lavagem simples durante 0,8 minutos com isopropanol;



- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com 1-metil-2-piperidona destilada;

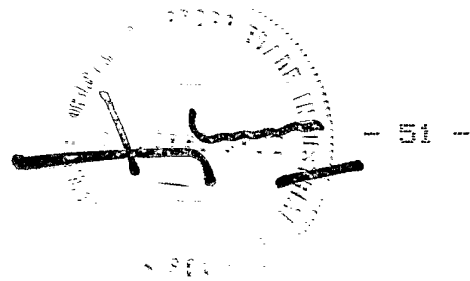
- adição do primeiro reagente de acoplamento, que foi preparado entretanto da maneira que se segue: dissolvem-se 2,7 mmol de Fmoc-L-amino ácido respectivo em 6,75 ml de uma mistura 0,4 molar de 1-hidroxi-1H-benzotriazole em 1-metil-2-piperidona, e adicionam-se 6,48 ml de uma solução 0,5 molar de diisopropilcarbodiimida em 1-metil-2-piperidona. A mistura da reacção é mantida à temperatura ambiente durante aproximadamente 40 minutos e depois usada nesta forma. A reacção de acoplamento em si mesma leva 40 minutos e a mistura da reacção é mantida a 50°;

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com 1-metil-2-piperidona destilada;

- adição do segundo reagente de acoplamento que foi preparado entretanto e tem a mesma composição do primeiro, tendo sido idêntica a sua preparação; a reacção de acoplamento efectua-se a 50° e leva 30 minutos (pode obter-se uma reacção quase completa com a segunda reacção de acoplamento);

- lavagem simples, com a duração de 0,4 minutos, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- tratamento simples com a duração de 4,5 minutos, com aproximadamente 30 ml de uma mistura de 1:1:8 (v/v/v) de anidrido acético, piridina e dimetilacetamida (para a acetilação de grupos



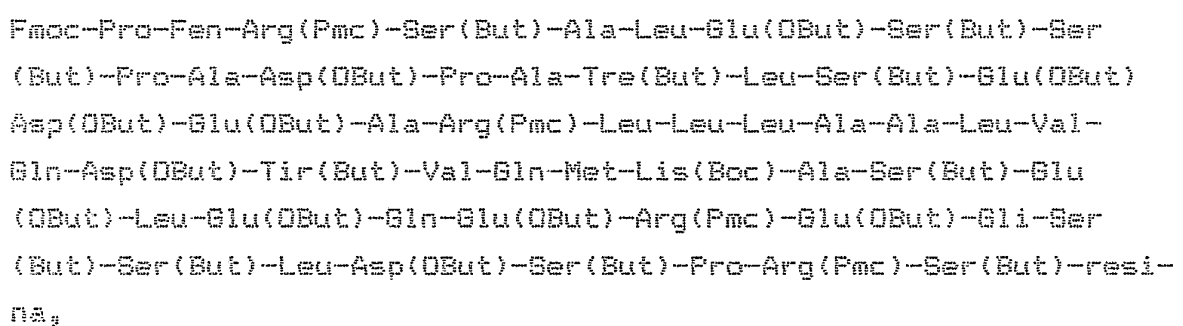
amino que ainda se encontram livres na cadeia peptidea crescente);

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

- uma lavagem simples durante 0,8 minutos com isopropanol; e

- três lavagens, com a duração de 0,4 minutos cada uma, com dimetilacetamida degaseificada sob pressão reduzida (isenta de dimetilamina);

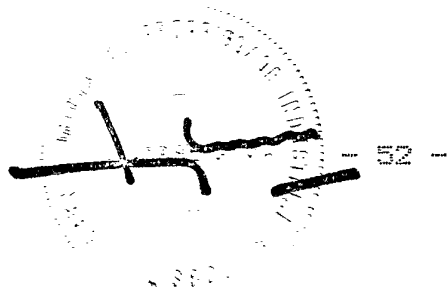
Obtém-se deste modo o intermediário Fmoc-peptideo/-resina usado como material de partida no Exemplo atrás descrito que tem a seguinte fórmula:



em que "resina" representa o radical poliestireno (ligação cruzada a 1% com divinilbenzeno)-metoxi-4-fenilmetoxi que esterifica o grupo carboxi.

Exemplo 2 : Substância estéril injectável

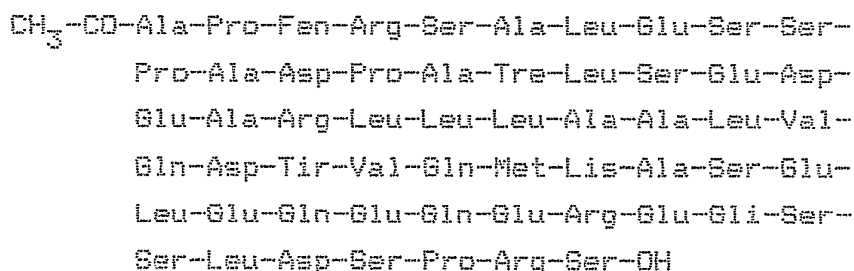
Dissolvem-se 0,1 mg do peptideo PCATFP (Exemplo 1) em 1 ml de uma solução aquosa juntamente com 20 mg de manitol. A solução



estéril é filtrada e introduzida sob condições assépticas numa ampola de 2 ml, fortemente congelada e liofilizada. Antes de utilizado, o liofilizado é dissolvido em 1 ml de água destilada ou em 1 ml de soro fisiológico e a solução é administrada, por exemplo, por via intramuscular ou intravenosa.

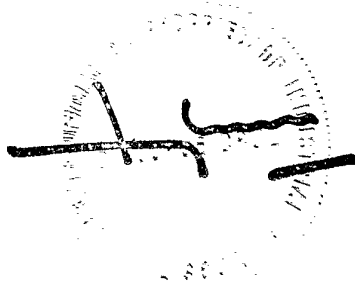
Exemplo 3 :

De maneira análoga à que foi descrita no Exemplo 1, mas acetilando com anidrido acético do modo descrito no Exemplo 1 o grupo amino livre da alanina terminal obtida após a remoção do grupo protector de Fmoc, obtém-se o seguinte:



Exemplo 4

De maneira análoga à que foi descrita no Exemplo 1, mas partindo de uma resina sintética preparada tal como a seguir se descreve, com ligação dos amino ácido protegidos que correspondem à estrutura do produto final desejado, mas usando Fmoc-Gln(tritilo)-OH em lugar de Fmoc-Gln-OH, e com a remoção final de todos os grupos protectores residuais com ácido trifluoroacético/água/1,2-etanodiol (95:5:5) durante um período de 40 minutos à temperatura ambiente, obtém-se o seguinte:



H-Ala-Pro-Phe-Arg-Ser-Ala-Leu-Glu-Ser-Ser-
Pro-Ala-Asp-Pro-Ala-Tre-Leu-Ser-Glu-Asp-
Glu-Ala-Arg-Leu-Leu-Leu-Ala-Ala-Leu-Val-
Gln-Asp-Tir-Val-Gln-Met-Lis-Ala-Ser-Glu-
Leu-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg-Glu-Gli-Ser-
Arg-Ile-Ile-Ala-Gln-OH

Os materiais de partida são obtidos tal como se segue:

Fmoc-Gln(Trt)-OH

Adicionam-se com agitação vigorosa 3,4 g de carbonato de 9-fluorenilmetil-succinimidinilo (10 mmol) em 20 ml de tetrahydrofurano e 10 ml a uma solução de 4 g de hemi-hidrato de H-Gln(Trt)-OH (10 mmol) em 20 ml de tetrahydrofurano e 10 ml de uma solução de hidróxido de sódio aquoso 1N, e ao mesmo tempo adicionam-se 1,4 ml de trietilamina de tal modo que o valor do pH atinja aproximadamente 8,5. Passados 20 minutos esse todo é arrefecido num banho de gelo, recoberto com acetato de etilo e acidificado com 25 ml de uma solução aquosa 1M de sulfato de potássio até se obter um valor do pH de 2-2,5. A fase orgânica é lavada com água até ficar neutra, seca sobre sulfato de sódio e concentrada para 30 g sob pressão reduzida. O produto é cristalizado pela adição em porções de 35 ml de éter diisopropílico. Depois de um repouso prolongado a temperatura reduzida, o material cristalino é isolado por filtração e lavado uma vez numa mistura de 1:4 de acetato de etilo e éter diisopropílico e três vezes com éter diisopropílico. O Fmoc-Gln(Trt)-OH ainda contém 0,5 ml de éter diisopropílico mesmo depois de secagem prolongada sob alto vácuo a 60°, p.f. a partir de 125° (fusão lenta com a libertação de éter diisopropílico)



Fmoc-Gln(Trt)-OH

Agita-se uma mistura de 7,4 g de Fmoc-Gln-OH (20 mmol) e 10,4 g de trifenilmetanol (40 mmol) em 300 ml de ácido acético a 100° durante 10 minutos. Depois da adição de 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado o todo é agitado a 100° durante mais 15 minutos, formando-se uma solução clara, amarela. Esta é concentrada por evaporação sob pressão reduzida a 60° e o resíduo é seco sob pressão reduzida durante 10 minutos. O resíduo sólido é dissolvido em 60 ml de ácido acético a 60°, deixado a 60° durante 20 minutos. Adicionam-se em seguida 2 ml de anidrido acético (20 mmol) e após uma hora a 60° o todo é concentrado por evaporação sob pressão reduzida. O resíduo oleoso é seco durante 10 minutos a 60°, depois é dissolvido em 100 ml de ácido acético e introduzido gota a gota em 500 ml de água gelada. O precipitado é isolado por filtração, bem lavado com água e dissolvido em acetato de etilo; a fase aquosa é separada por filtração e a fase orgânica é lavada com uma solução saturada de cloreto de sódio. Depois de seca sobre sulfato de sódio, a solução orgânica é concentrada até à secura por evaporação, o resíduo é dissolvido em 50 ml de 1,2-dicloroetano e aplicado a 100 g de gel de sílica; a eluição efectua-se com 1,2-dicloroetano e com 1,2-dicloroetano contendo 2% e depois 4% de metanol. As fracções contendo Fmoc-Gln(Trt)-OH são concentradas por evaporação sob pressão reduzida e o produto é cristalizado a partir de uma mistura de acetato de etilo e éter diisopropílico, p.f. a partir de 125°.

Resina sintética

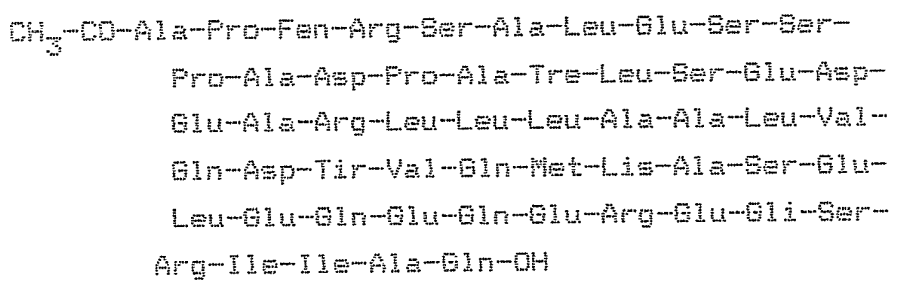
Adicionam-se 3,35 ml (23,4 mmol) de cloreto de 2,4-diclorobenzoilo (Fluka) em 4 porções durante um periodo de 5 horas a uma suspensão de 10 g do chamado poliestireno de álcool 4-benziloxibenzílico (0,78 mmol OH/g; ligação cruzada 1% com

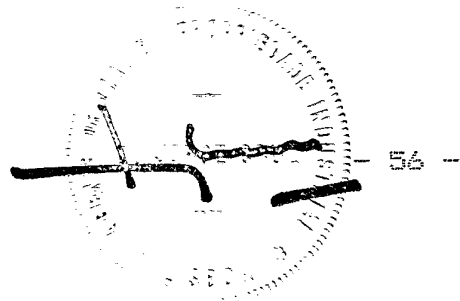


divinilbenzeno; Os grupos fenilo do poliestireno são substituídos na posição 4 com 4-hidroximetilfenoximeto; Novabiochem), 15,6 mmol de Fmoc-Gln(Trt)-OH e 3,1 ml (38,5 mmol) de piridina em 60 ml de dimetilacetamida, e o todo é agitado durante 24 horas. A resina é isolada por filtração e cuidadosamente lavada com metanol e com 1,2-dicloroetano. A resina tem uma carga de 0,48 mmol/g (determinação fotométrica de Fmoc). Os grupos residuais OH são acetilados durante 2 horas com anidrido acético/piridina/-dimetilacetamida 1:1:8 antes do começo da síntese dos peptídeos.

Exemplo 5

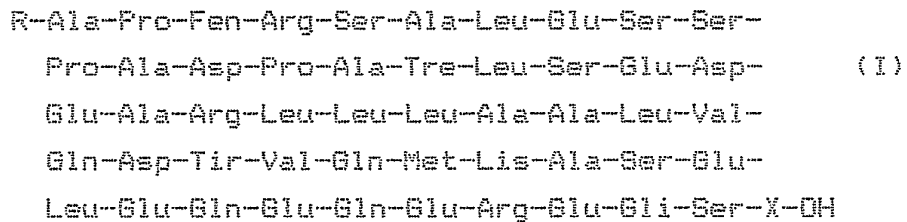
De maneira análoga à descrita no Exemplo 4, mas por acetilação com anidrido acético, tal como foi descrito no Exemplo 1, do grupo amino livre da alanina terminal obtida após remoção do grupo protector de Fmoc, obtém-se o seguinte:





Reivindicações

1ª - Processo para a preparação de um péptido de fórmula (I),



em que R representa hidrogénio ou acetilo e X a sequência de amino ácidos de fórmula -Ser-Leu-Asp-Ser-Pro-Arg-Ser- (Ia) ou da fórmula -Arg-Ile-Ile-Ala-Gln (Ib), e dos sais dos referidos compostos, caracterizado por

a) se formar, uma ligação amida presente num composto com a sequência de amino ácidos de fórmula I, por reacção de um fragmento desse composto, que apresenta um grupo carboxi livre reactivo, ou um seu derivado de ácido carboxílico reactivo, com o fragmento complementar do referido composto, que apresenta um grupo amino livre, ou com um seu derivado reactivo, em que os grupos funcionais livres nos referidos fragmentos, com a excepção dos dois grupos que participam na reacção, estão, se necessário, numa forma protegida, e por se remover os grupos protegidos que possam estar presentes, ou

b) se propagar células hospedeiras, transformadas com um vector de expressão, que contém uma sequência de DNA que codifica a sequência de amino ácidos de fórmula I e que é regulada por uma sequência de controlo de expressão, e, caso seja necessário, se libertar das células hospedeiras um



composto com a sequência de amino ácidos de fórmula I, e se isolar, e, quando for necessário, num composto obtido de acordo com o invento, contendo um agrupamento sulfóxido, se converter este agrupamento num grupo tio, e sempre que se deseje, se converter o sal obtido de acordo com o processo no composto livre e/ou se converter o composto livre obtido de acordo com o processo num sal.

2ª - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por se escolher os materiais de partida de modo a preparar um péptido de fórmula I, em que R representa hidrogénio e X tem o significado referido na Reivindicação 1, ou um sal desse composto.

3ª - Processo de acordo com a Reivindicação 2, caracterizado por se escolher os materiais de partida de modo a preparar um péptido de fórmula I, em que X representa uma sequência de amino ácidos de fórmula -Ser-Leu-Asp- Ser-Pro-Arg-Ser-(Ia), ou um sal desse composto.

Lisboa, 24 de Agosto de 1989

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA